

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

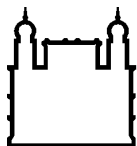
**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA  
COLEÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DA FIOCRUZ (FIOCRUZ-  
COLPROT)**

**Carolina Boucinha Martins**

**Orientadora:** Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

**RIO DE JANEIRO**

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Carolina Boucinha Martins**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA  
COLEÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DA FIOCRUZ (FIOCRUZ-  
COLPROT)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

**RIO DE JANEIRO**

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M386 Martins, Carolina Boucinha

Identificação molecular de Tripanossomatídeos da coleção de protozoários da  
Fiocruz (Fiocruz-Colprot) / Carolina Boucinha Martins. – Rio de Janeiro, 2016.

xx, 178 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 156-164

1. Identificação molecular. 2. Taxonomia. 3. Tripanossomatídeos. 4. Coleções  
biológicas. I. Título.

CDD 579.84

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Carolina Boucinha Martins**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA  
COLEÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DA FIOCRUZ (FIOCRUZ-  
COLPROT)**

**ORIENTADORA:** Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elisa Cupolillo - Presidente**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marta Helena Branquinha de Sá**

**Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque**

**Prof. Dr. Diogo Antonio Tschoeke- 1º suplente**

**Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan- 2º suplente**

Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, namorado e amigos que, de uma certa forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo agradecer a minha orientadora, minha amiga, amiga da irmã, amiga do meu namorado, amiga dos meus amigos, amiga da minha família, Dra. Claudia Masini d'Avila Levy. Toda minha gratidão por acreditar em mim, confiar no meu trabalho e aceitar ser minha orientadora apesar de todos os rótulos que a vida nos deu. A responsabilidade sempre foi muito maior, mas deu certo e sempre foi um enorme prazer poder trabalhar ao seu lado e fazer parte da sua equipe e do seu laboratório. O meu “muito obrigada” sempre será pouco.

Aos meus pais, primeiramente porque sem eles, eu jamais estaria aqui (literalmente). Minha mãe Rosângela, que apesar de não fazer ideia do que eu faço, sempre achou que meu trabalho era muito importante, e sempre contou isso com um enorme orgulho de mim. Ao meu pai Paulo, aquele que me escolheu e que infelizmente não pôde estar comigo nessa jornada, mas que durante sua proveitosa vida sempre foi um grande incentivador. Amo muito vocês.

Às minhas amadas irmãs, Juliana e Ana. A minhas tias, primos e família. Obrigada por todo o carinho. Amo vocês.

À minha afilhada Alice e sobrinhas Marina e Maria Clara. A vida com certeza tem mais graça quando estamos perto de crianças. Obrigada pelo amor e por todo sorriso dado nas horas difíceis.

Ao meu “namorado” Bernardo, aquele que sempre soube o que eu precisava ouvir, mesmo sem saber como dizer. Aquele que sempre me incentivou, com muito carinho e muito amor. Obrigada por aceitar a aventura que é dividir a vida e muito obrigada por toda a paciência. Sua sabedoria e conselhos foram essenciais nesta trajetória. Amo muito você!

À Dra. Constança Britto, pesquisadora chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, que me recebeu recém-chegada ao seu laboratório e permitiu o desenvolvimento de parte do meu projeto.

Ao Dr. Fernando Monteiro, coordenador da rede Parasitos e Vetores do Brasil do Projeto BR-BOL, onde iniciei meu trabalho e aprendi, sob a diligente supervisão da Dra. Karina A. Morelli, tudo o que seria necessário para a realização do meu mestrado. De uma certa forma, soube me desafiar e acabou tirando o melhor de mim, mesmo que sem querer.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratório de Referência da Fiocruz (VPPLR) e o

Instituto Oswaldo Cruz financiaram a estruturação da Plataforma de Identificação Molecular de Parasitos e Vetores do Brasil, que foi essencial para alavancar meu trabalho e despertar meu interesse por taxonomia e identificação molecular.

À Professora Dra. Karina Morelli, que me ensinou praticamente tudo o que sei de biologia molecular. Obrigada por todo apoio durante essa fase. Quem me dera poder ser metade da profissional que você é. Minha co-orientadora que se tornou uma grande amiga, sempre disposta a me ajudar e acalmar em momentos de desespero! Muito obrigada. Ah! E à Sofia também! Sou muito feliz por ter vocês em minha vida.

Agradeço imensamente a cada um dos “Lesmas”, onde realizei grande parte dos meus experimentos e ganhei grandes amigos! Quem dera todos tivessem oportunidade de trabalhar com um grupo como o nosso. Carla (Carlota), Marina, Jessica (sem acento rs), Paloma (que acabou de nos dar um lindo mascotinho), Andreia, Amandinha, Karina, Bia, Joana e o bendito fruto, Márcio. Cada um com seu jeito, sempre dispostos a ajudar um ao outro. Obrigada por cada momento ao lado de vocês.

À técnica do nosso laboratório, Sheila Medeiros dos Santos Pereira, que carinhosamente chamamos de Sheilinha. Muito obrigada por me ensinar a “cuidar” dos nossos “bichinhos” e um muito obrigada ainda por todas as culturas fornecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rhagner, técnico e amigo. Obrigada por toda ajuda e principalmente por deixar o ambiente de trabalho mais divertido com sua enorme alegria de viver! Seja sempre assim!

Ao Vitor, quem sempre exerceu mais do que seu trabalho de técnico. Exerceu bastante a paciência em me ouvir e sempre soube o que dizer.

À Professora Dra. Aline Garcia que sempre foi um exemplo de profissional e se tornou uma grande amiga. Obrigada pelas conversas, pelos vinhos, pela companhia, pela experiência, pela amizade, pelo carinho e por tudo mais!

A todos os demais alunos e pesquisadores do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia (Bia, André, Amanda, Keyla, Carol, Helena e Karina) pelo companheirismo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

À equipe da Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT01A), que faz parte da Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ. A plataforma foi

fundamental para a realização deste trabalho, e à Fiocruz pela estruturação e financiamento desta Plataforma.

Ao Dr. Márcio Pavan pela amizade, pelos ensinamentos e por aceitar ser o revisor desta dissertação.

Agradeço também aos integrantes da banca examinadora por terem aceitado o convite e pelas futuras sugestões para o melhoramento desta dissertação.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, e à rede BrBol/CNPQ, a FAPERJ e a FIOCRUZ pelo apoio financeiro e estrutural.

A todos da Secretaria Acadêmica.

À 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.

Muito, muito, muito obrigada!



# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xx</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. Revisão da Literatura</b>	<b>1</b>
1.1. Kinetoplastea	1
1.2. A família Trypanosomatidae	3
1.3. Proposta das subfamílias	7
<b>2. Taxonomia de Tripanossomatídeos de insetos e plantas</b>	<b>14</b>
2.1. Tripanossomatídeos que albergam simbiontes: <i>Angomonas</i> , <i>Strigomonas</i> e <i>Kentomonas</i>	14
2.2. <i>Novymonas</i>	15
2.3. <i>Crithidia</i>	16
2.4. <i>Herpetomonas</i>	17
2.5. <i>Leptomonas</i>	17
2.6. <i>Phytomonas</i>	18
2.7. <i>Wallacemonas</i>	19
2.8. <i>Lotmaria</i>	19
2.9. <i>Lafontella</i>	20
2.10. <i>Rhynchoidomonas</i>	20
2.11. <i>Sergeia</i>	20
2.12. <i>Blastocrithidia</i>	20
2.13. <i>Blechomonas</i>	21
2.14. <i>Paratrypanosoma</i>	21
2.15. <i>Jaenimonas</i>	22
<b>3. Utilização de genes para as análises taxonômicas e filogenéticas de tripanossomatídeos</b>	<b>22</b>
3.1. Genes utilizados para análises taxonômicas e filogenéticas dos tripanossomatídeos de insetos e plantas depositados na COLPROT	23
3.1.1. O gene Ribossomal	23
3.1.1.1. Região V7V8 SSU RNAr	23

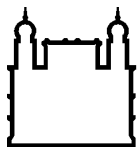
3.1.2. O gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH)	24
3.1.3. O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI)	24
<b>4. Coleções Biológicas</b>	<b>25</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
1) Objetivo geral	
2) Objetivo específico	
<b>III. METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>1) Origem das amostras</b>	<b>28</b>
1.1. Tripanossomatídeos a serem estudados e método de cultivo	
<b>2) Identificação molecular</b>	<b>28</b>
a) Extração e quantificação de DNA	
b) Reação em cadeia da polimerase	
c) Eletroforese de DNA em gel de agarose	
d) Purificação do produto de PCR	
e) Sequenciamento	
f) Análise das sequências	
g) Análises filogenéticas	
h) Análises da divergência genética	
i) Pesquisa histórica dos registros dos depósitos da Coleção de Protozoários	
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>V. CONCLUSÕES</b>	<b>155</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>156</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>165</b>
<b>Anexo I-</b> Tabela de divergência nucleotídica baseada na matriz de distância Kimura 2-parâmetros entre as espécies utilizadas neste trabalho para os marcadores gGAPDH, SSUrRNA e COI	<b>CD</b>
<b>Anexo II-</b> Divergência nucleotídica entre espécies do gênero <i>Angomonas</i> baseada na matriz de distância Kimura 2-parâmetros para os marcadores gGAPDH, SSUrRNA e COI	<b>165</b>

**Anexo III-** Divergência nucleotídica entre espécies do gênero *Herpetomonas* baseada na matriz de distância Kimura 2-parâmetros para os marcadores gGAPDH, SSUrRNA e COI **166**

**Anexo IV-** Divergência nucleotídica das sequências dos genes SSUrRNA e gGAPDH entre gêneros de tripanossomatídeos com sequências disponíveis no *Genbank*. Foram utilizadas sequências dos gêneros *Angomonas*, *Strigomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Blechnomonas*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e *Crithidia*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros **CD**

**Anexo V-** Divergência nucleotídica das sequências dos genes SSUrRNA e gGAPDH entre espécies de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros **168**

**Anexo VI-** Artigo publicado **169**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA COLEÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DA FIOCRUZ (FIOCRUZ- COLPROT)

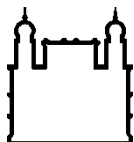
## RESUMO

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Carolina Boucinha Martins**

A classe Kinetoplastea tem como apomorfia o cinetoplasto, rede de DNA mitocondrial altamente compactada, e alberga protozoários da família Trypanosomatidae descritos como parasitas uniflagelados. A Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT) conta com um vasto acervo de integrantes da família Trypanosomatidae. O estudo acerca dos tripanossomatídeos de insetos e plantas tem sido negligenciado e as principais espécies conhecidas foram descritas com base exclusivamente na morfologia, ciclo de vida, e hospedeiro de isolamento. Entretanto, apenas a metodologia utilizada pela taxonomia clássica nem sempre reflete as relações filogenéticas dos organismos. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi revisar a identificação taxonômica dos tripanossomatídeos de insetos e plantas depositados na COLPROT, utilizando as ferramentas moleculares atuais. Para isso, foram utilizados dois marcadores nucleares (gGAPDH e V7V8 SSUrRNA), que têm larga base de dados no *Genbank* e são amplamente difundidos como ferramenta taxonômica de tripanossomatídeos. Optamos também pela análise de parte do gene mitocondrial COI, utilizado como marcador universal na identificação de espécies animais, visando dar início a construção de um banco de dados desse gene para tripanossomatídeos. Durante nossas análises, ficou evidente que não há um consenso na literatura a respeito dos limiares de divergência genética aceitáveis para a determinação de novos gêneros e espécies e para a sinonímia destes. Nós realizamos então uma exaustiva busca na literatura dos principais autores estudiosos destes tripanossomatídeos e fizemos o levantamento de todas as sequências disponíveis no *Genbank* dos marcadores mais utilizados

(SSUrRNA e gGAPDH). Através da comparação destas sequências, foram estabelecidos os valores de 2% de divergência genética para limitação de espécies para o marcador V7V8 SSUrRNA e 4% de divergência genética para o marcador gGAPDH. Para limitação de gênero, nós estabelecemos 11% de divergência genética para ambos os marcadores. Tendo constituído estes valores para os marcadores SSUrRNA e gGAPDH juntamente com a análise do marcador COI, nós realizamos a curadoria da COLPROT. Este resultado ficou dividido em quatro partes: i) a confirmação taxonômica de 45 depósitos; ii) a identificação taxonômica de 29 depósitos sem caracterização prévia; iii) a identificação de 13 depósitos sujeitos a revisão taxonômica; iv) a identificação de dois depósitos candidatos a novos gêneros e outros dois depósitos candidatos a espécie nova. Os resultados nos fizeram observar que o marcador COI foi capaz de discriminar as espécies e gêneros dos tripanossomatídeos estudados, corroborando os marcadores mais utilizados. Isso confirma a aplicabilidade deste marcador como *barcode* de tripanossomatídeos. Por último, nós realizamos o resgate histórico do acervo da COLPROT, organizando e informatizando toda a informação disponível a respeito de cada depósito utilizado neste trabalho. Essas informações foram consolidadas em um banco de dados (Sicol) e o acervo da Coleção pode ser consultado no site da COLPROT ([www.colprot.fiocruz.br](http://www.colprot.fiocruz.br)). Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade de uma ampla revisão taxonômica de tripanosomatídeos isolados de insetos e planta descritos antes da identificação molecular, e ressaltam a importância do trabalho de curadoria das coleções biológicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### MOLECULAR IDENTIFICATION OF INSECT AND PLANT TRYPANOSOMATIDS DEPOSITED AT FIOCRUZ PROTOZOA CULTURE COLLECTION (FIOCRUZ-COLPROT)

#### ABSTRACT

#### MASTER DEGREE

**Carolina Boucinha Martins**

The Kinetoplastea class apomorpha is kinetoplast, a highly compacted mitochondrial DNA network, and houses protozoa of the Trypanosomatidae family described as uniflagellate parasites. The FioCruz Protozoan Collection (COLPROT) has a large collection of members of the Trypanosomatidae family. The study on trypanosomatids from insects and plants has been neglected and the main known species have been described based exclusively on morphology, life cycle, and isolation host. However, only the methodology used by classical taxonomy does not always reflect the phylogenetic relationships of organisms. In view of this, the aim of this study was to review the taxonomic identification of trypanosomatids from insects and plants deposited in COLPROT, using the current molecular tools. For this, two nuclear markers (gGAPDH and V7V8 SSUrRNA) were used, which have a comprehensive data base in Genbank and are widely used as a taxonomic identification of trypanosomatids. We also opted for the analysis of part of the mitochondrial COI gene, used as a universal marker in the identification of animal species, in order to initiate the assembly of a database of this gene for trypanosomatids. During our analyzes, it was evident that there is no consensus in the literature regarding the thresholds of genetic divergence acceptable for the determination of new genus and species. Then, we carried out an exhaustive search in the literature of the main authors of these trypanosomatids and surveyed all the sequences available in Genbank from the most used markers (SSUrRNA and gGAPDH). By comparing these sequences, 2% genetic divergence values were established for species limitation for the V7V8 SSUrRNA marker and 4% genetic divergence for the gGAPDH marker. For genus delimitation, we have established 11% genetic divergence for both markers. Having constituted these values for the SSUrRNA and gGAPDH markers along with the analysis of the COI marker, we performed the curatorship of COLPROT. This result was divided into four parts: i) the

taxonomic confirmation of 45 deposits; ii) the taxonomic identification of 29 deposits without previous characterization; iii) the identification of 13 deposits subject to taxonomic revision; iv) the identification of two candidates for new genera and two new candidates for new species. The results showed that the COI marker could discriminate the species and genera of the trypanosomatids studied, corroborating the most commonly used markers. This confirms the applicability of this marker as a barcode of trypanosomatids. Finally, we carry out the historical rescue of the collection of COLPROT, organizing and digitalizing all available information regarding each deposit used in this work. This information was consolidated in a database (Sicol) and the collection of the Collection can be consulted on the COLPROT website ([www.colprot.fiocruz.br](http://www.colprot.fiocruz.br)). The results presented here indicate the need for a comprehensive review of insect and plant trypanosomatids taxonomy, which were described before the molecular era, and emphasize the importance of the curation of biological collections.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Esquema atualizado da taxonomia de cinetoplastídeos.	2
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática das diferentes formas presentes em tripanossomatídeos.	4
<b>Figura 3-</b> Árvore filogenética da família Trypanosomatidae proposto por Jirků e colaboradores (2012) sugerindo a criação da subfamília Leishmaniinae.	8
<b>Figura 4-</b> Árvore filogenética da família Trypanosomatidae baseada na análise sequências concatenadas dos genes gGAPDH e SSUrRNA proposto por Votýpka e colaboradores (2013) sugerindo a criação da subfamília Blechomonadinae.	10
<b>Figura 5-</b> Árvore filogenética da família Trypanosomatidae com a sugestão das subfamílias proposto por Votýpka e colaboradores (2015).	11
<b>Figura 6-</b> Árvore filogenética da família Trypanosomatidae baseada na análise sequências concatenadas dos genes gGAPDH e SSUrRNA proposto por Yurchenko e colaboradores (2016) sugerindo a criação da subfamília Phytomonadinae.	13
<b>Figura 7-</b> Representação gráfica do atual acervo da COLPROT.	26
<b>Figura 8-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH	37
<b>Figura 9-</b> Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> para o gene gGAPDH	42
<b>Figura 10-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSUrRNA.	43
<b>Figura 11-</b> Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> para o gene SSUrRNA	47
<b>Figura 12-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene COI	49
<b>Figura 13-</b> Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> para o gene COI	50
<b>Figura 14-</b> Representação gráfica dos principais resultados obtidos	57
<b>Figura 15-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Crithidia luciliae thermophila</i> .	61
<b>Figura 16-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Crithidia luciliae thermophila</i> .	62
<b>Figura 17-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene COI para o grupo que inclui a espécie <i>Crithidia luciliae thermophila</i> .	63



- Figura 18-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. **65**
- Figura 19-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. **66**
- Figura 20-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. **67**
- Figura 21-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia flexonema*. **69**
- Figura 22-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia flexonema*. **70**
- Figura 23-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia otongatchiensis*. **71**
- Figura 24-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia otongatchiensis*. **72**
- Figura 25-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas tarcoles*. **75**
- Figura 26-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas tarcoles*. **76**
- Figura 27-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas pyrrhocoris*. **78**
- Figura 28-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas pyrrhocoris*. **79**
- Figura 29-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas seymouri*. **80**
- Figura 30-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas seymouri*. **81**
- Figura 31-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui as espécies *Leptomonas jaderae* e *Leptomonas podlipaev*. **83**
- Figura 32-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui as espécies *Leptomonas jaderae* e *Leptomonas podlipaev*. **84**

<b>Figura 33-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas samueli</i> .	<b>86</b>
<b>Figura 34-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene COI para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas samueli</i> .	<b>87</b>
<b>Figura 35-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Leptomonas costaricensis</i> .	<b>88</b>
<b>Figura 36-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Leptomonas costaricensis</i> .	<b>89</b>
<b>Figura 37-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas muscarum</i> .	<b>92</b>
<b>Figura 38-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas muscarum</i> .	<b>93</b>
<b>Figura 39-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene COI para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas muscarum</i> .	<b>94</b>
<b>Figura 40-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas samuelpessoai</i> .	<b>96</b>
<b>Figura 41-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas samuelpessoai</i> .	<b>97</b>
<b>Figura 42-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas isaaci</i> .	<b>98</b>
<b>Figura 43-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas isaaci</i> .	<b>99</b>
<b>Figura 44-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas elegans</i> .	<b>100</b>
<b>Figura 45-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas elegans</i> .	<b>101</b>
<b>Figura 46-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas modestus</i> .	<b>102</b>
<b>Figura 47-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas modestus</i> .	<b>103</b>

<b>Figura 48-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas mirabilis</i> .	<b>105</b>
<b>Figura 49-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas mirabilis</i> .	<b>106</b>
<b>Figura 50-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Herpetomonas costoris</i> .	<b>108</b>
<b>Figura 51-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas ambiguus</i> .	<b>110</b>
<b>Figura 52-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas ambiguus</i> .	<b>111</b>
<b>Figura 53-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas desouzai</i> .	<b>113</b>
<b>Figura 54-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas desouzai</i> .	<b>114</b>
<b>Figura 55-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas deanei</i> .	<b>116</b>
<b>Figura 56-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Angomonas deanei</i> .	<b>117</b>
<b>Figura 57-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Strigomonas oncopelti</i> .	<b>119</b>
<b>Figura 58-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Strigomonas oncopelti</i> .	<b>120</b>
<b>Figura 59-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Strigomonas culicis</i> .	<b>121</b>
<b>Figura 60-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Kentomonas sorsogonicus</i> .	<b>122</b>
<b>Figura 61-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie <i>Phytomonas serpens</i> .	<b>124</b>
<b>Figura 62-</b> Análise de <i>Neighbor-joining</i> para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie <i>Phytomonas serpens</i> .	<b>125</b>

- Figura 63-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas françai*. **127**
- Figura 64-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas nordicus*. **128**
- Figura 65-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o candidato a nova espécie. **130**
- Figura 66-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o candidato a nova espécie. **131**
- Figura 67-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o candidato a nova espécie. **132**
- Figura 68-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o candidato a nova espécie. **134**
- Figura 69-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o candidato a nova espécie. **135**
- Figura 70-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o candidato a nova espécie. **136**
- Figura 71-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o candidato a novo gênero. **138**
- Figura 72-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o candidato a novo gênero. **139**
- Figura 73-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o candidato a novo gênero. **141**
- Figura 74-** Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU. O táxon em vermelho indica o candidato a novo gênero. **142**

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Espécies de tripanossomatídeos que tiveram sua taxonomia revista ao longo dos anos.	<b>5</b>
<b>Tabela 2-</b> Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo gGAPDH.	<b>29</b>
<b>Tabela 3-</b> Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo SSUrRNA.	<b>29</b>
<b>Tabela 4-</b> Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo COI.	<b>30</b>
<b>Tabela 5-</b> Descrição dos iniciadores.	<b>30</b>
<b>Tabela 6-</b> Sequências do Genbank utilizadas para comparação taxonômica entre as espécies utilizadas no trabalho.	<b>32</b>
<b>Tabela 7-</b> Total de depósitos que tiveram a identidade taxonômica confirmadas separados por gêneros.	<b>55</b>
<b>Tabela 8-</b> Total de depósitos que foram identificados de acordo com sua taxonomia separados por gêneros.	<b>56</b>
<b>Tabela 9-</b> Espécies de tripanossomatídeos depositadas na COLPROT que tiveram sua taxonomia revista.	<b>56</b>
<b>Tabela 10-</b> Resultado da confirmação taxonômica de espécies de <i>Crithidia</i> depositados na COLPROT.	<b>73</b>
<b>Tabela 11-</b> Compilação dos resultados obtidos durante a curadoria da COLPROT	<b>143</b>

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

- COI-** Citocromo Oxidase I
- COLPROT-** Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz
- DMSO-** Dimetilsulfóxido
- DNA-** “desoxiribonucleic acid” Ácido Desoxirribonucleico
- GB-** “*Genbank*”- banco de sequências
- gGAPDH-** Glicossomal Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase
- Hsp83-** “Heat shock protein 83” Proteína de choque térmico
- IB-** Inferência Bayesiana
- IOC-** Instituto Oswaldo Cruz
- K2-p-** Kimura 2- parâmetros
- kDNA-** DNA do cinetoplasto
- ML-** Máxima Verossimilhança
- NJ-** Neighbor-Joining
- pb-** pares de base
- PBS-** Tampão Fosfato Salina
- pH-** Potencial Hidrogeniônico
- RNA-** “ribonucleic acid” Ácido ribonucleico
- rRNA-** Ácido ribonucleico ribossomal
- SDS-** “Sodium Dodecyl Sulfate” (Lauril Sulfato de Sódio)
- SFB-** Soro Fetal Bovino
- SSU-** “Small subunit” Subunidade menor
- UT-** Unidade de tipagem taxonômica

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Revisão da Literatura

### 1.1. Kinetoplastea

A classe Kinetoplastea pertencente ao reino Excavata, filo Euglenozoa (Honigberg, 1963; Cavalier-Smith, 1998, 2004) e compõe um grupo de protozoários que possuem um ou dois flagelos emergindo de uma bolsa flagelar, que podem existir tanto na forma de vida livre quanto formas parasitas de vertebrados, invertebrados e plantas (Wallace, 1966). A classe foi definida segundo parâmetros morfológicos, por apresentarem como apomorfia a presença do cinetoplasto. O cinetoplasto é caracterizado como DNA mitocondrial, conhecido como kDNA e altamente condensado. A mitocôndria é única nesses organismos, ramificada e se estende por todo o corpo celular (Vickerman, 1976).

Os cinetoplastídeos apresentam, pelo menos, três padrões diferentes de organização do cinetoplasto (Lukes *et al.* 2002):

- a) Pancinetoplasto: kDNA se distribui pela matriz mitocondrial. Padrão presente em *Bodo caudatus* e espécies do gênero *Cryptobia*;
- b) Policinetoplasto: kDNA está distribuído como grânulos diferentes dentro da mitocôndria. Este padrão está presente principalmente em espécies do gênero *Dimastigella*.
- c) Eucinetoplasto: kDNA como massa única, condensado e próxima à base do flagelo. Padrão típico dos tripanossomatídeos e *Bodo saltans*.

Tradicionalmente, a classe Kinetoplastea era conhecida como ordem Kinetoplastida que por sua vez era dividida em duas subordens: Trypanosomatina e Bodonida, ambas definidas por caracteres morfológicos, presença do cinetoplasto e ciclo de vida destes protozoários (Simpson *et al.* 2006; Stevens 2008). Recentemente, a partir de estudos filogenéticos foi possível observar novas relações de parentesco entre os integrantes destas subordens, conduzindo a uma revisão taxonômica do grupo. Foi proposto que a atual classe Kinetoplastea fosse dividida em duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A subclasse Prokinetoplastina apresenta apenas a ordem Prokinetoplastida, que por sua vez, apresenta dois gêneros: *Ichthyobodo* e *Perkinsella*. A subclasse Metakinetoplastina apresenta quatro ordens, das quais três são de bodonídeos (Neobodonida, Eubodonida e Parabodonida), e a ordem Trypanosomatida, representada por uma única família (Trypanosomatidae)

representada por parasitas obrigatórios (Moreira *et al.* 2004; Stevens *et al.*, 2008; Deschamps *et al.*, 2011; d'Ávila Levy *et al.*, 2015) (Figura 1).

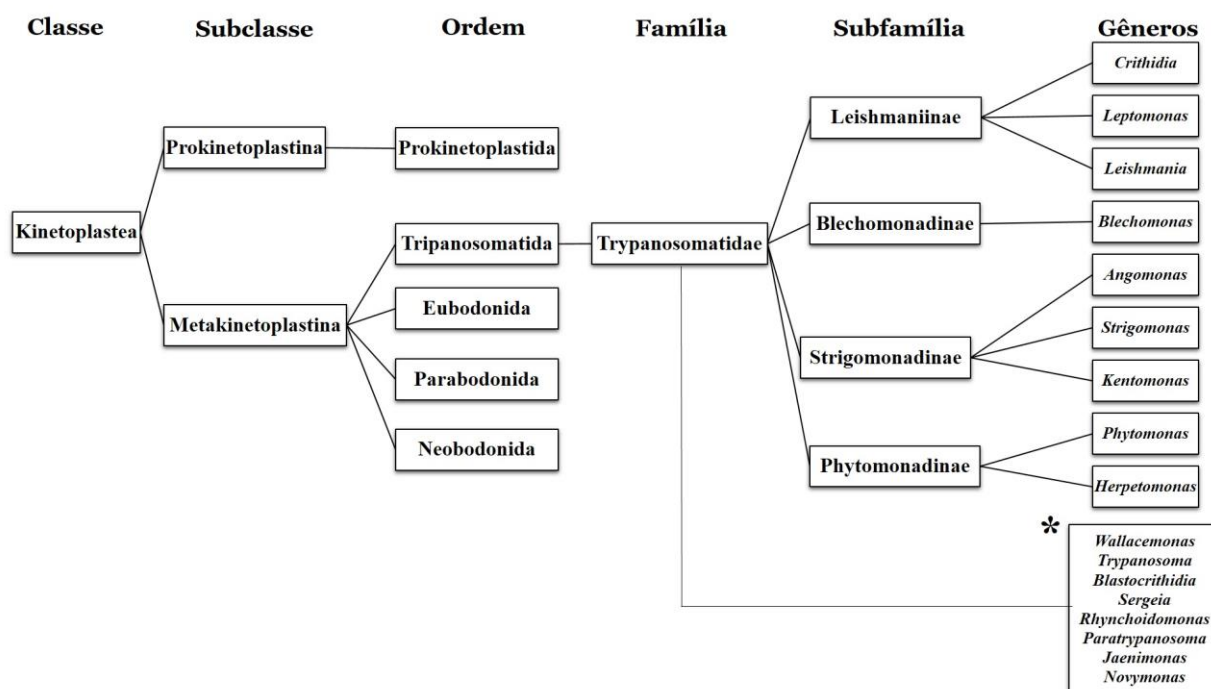


Figura 1- Esquema atualizado da taxonomia de cinetoplastídeos. O filo Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981) engloba cinco classes, entre as quais a classe Kinetoplastea, que se divide em duas subclasses. A maior parte da diversidade descrita atualmente está dentro da subclasse Metakinetoplastina que, por sua vez, é subdividida em quatro ordens. A ordem Trypanosomatida engloba representantes responsáveis por doenças humanas e contém o maior número de gêneros e espécies descritos. Este organograma compila dados taxonômicos de Moreira *et al.* (2004). Modificado de d'Ávila-Levy *et al.* (2015). \*Gêneros que ainda não foram distribuídos em subfamília.



## 1.2. A família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae abrange protozoários flagelados, parasitas obrigatórios de uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados, invertebrados, principalmente de plantas e insetos de quase todas as ordens conhecidas. Apresenta uma ampla distribuição geográfica, tendo sido descrita em todos os continentes (Vickerman, 1994; Stevens *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2006). Embora a maioria dos representantes desta família pareça não ser prejudicial aos seus hospedeiros, alguns destes organismos são capazes de parasitar seres humanos e animais domésticos e selvagens, o que faz desses organismos importantes agentes etiológicos.

Em relação ao ciclo de vida, os tripanossomatídeos são divididos em dois grupos: heteroxênicos e monoxênicos. Tripanossomatídeos heteroxênicos são caracterizados por apresentarem dois hospedeiros em seu ciclo biológico, sendo um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado ou uma planta. Esse grupo é amplamente conhecido por conter espécies responsáveis por importantes enfermidades em humanos e outros mamíferos. Leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono são graves patologias humanas causadas por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente (Vickerman, 1994; Stuart *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2014). *Trypanosoma brucei evansi* é responsável por infectar e causar a doença “surra” em diversos animais domésticos e selvagens por todo o mundo (Carnes *et al.*, 2015). Além dos patógenos de animais e humanos, espécies do gênero *Phytomonas* representam verdadeiras pragas agrícolas, especialmente para espécies de coqueiros, café e palmeiras e podem ocasionar consideráveis perdas econômicas aos produtores de tomates (Dollet, 1984; Camargo, 1999; Jaskowska *et al.*, 2015).

Os tripanossomatídeos monoxênicos são caracterizados por completarem seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro e são amplamente descritos como parasitos do trato intestinal de insetos, principalmente das ordens Diptera e Hemiptera (Vickerman, 1976; Wallace, 1966; Wallace *et al.*, 1983; Simpson *et al.*, 2006; Stevens, 2008). Todos os tripanossomatídeos diferem quanto à forma, largura e comprimento do corpo. O tamanho do cinetoplasto e posição dele em relação ao núcleo, tamanho de flagelo livre e a presença ou ausência de membrana ondulante também são fundamentais para determinar as diferentes formas assumidas por estes flagelados ao longo do seu ciclo de vida (Figura 2): epimastigota, tripomastigota, promastigota, opistomastigota, coanomastigota, amastigota, esferomastigota e opistomorfa. Além destas, foram descritas outras duas formas consideradas como estágio de transição: paramastigota e

endomastigota (Wallace, 1966; Wallace *et al.* 1983; Teixeira *et al.*, 1997). Durante muito tempo, essas formas foram associadas a gêneros específicos. No entanto, já se sabe que estes organismos podem apresentar mais de uma morfologia ao longo de seu ciclo de vida. Além disso, não possuem especificidade em relação ao hospedeiro e podem apresentar infecção mista. Dessa forma, a descrição de novas espécies de tripanossomatídeos deve considerar a taxonomia integrativa (Votýpka *et al.* 2015).

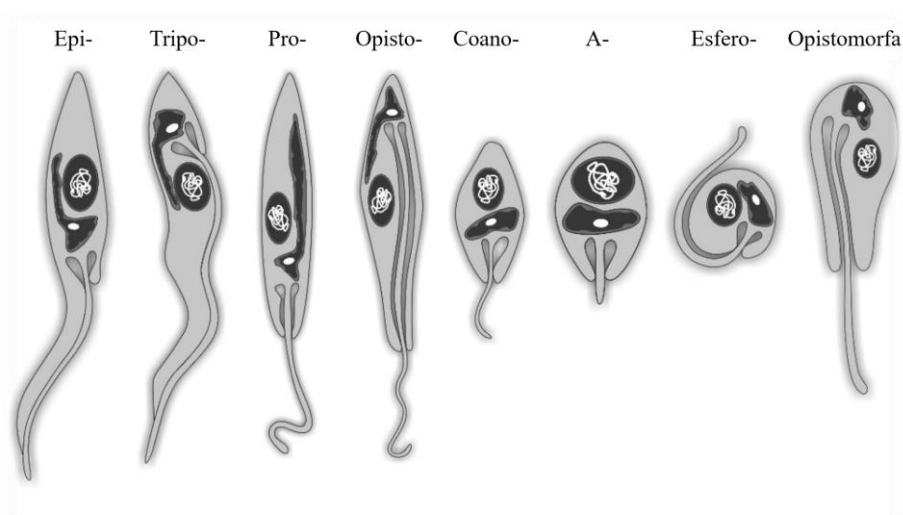


Figura 2- Representação esquemática das diferentes formas presentes em tripanossomatídeos; o traço deve ser substituído pelo termo "mastigota". Modificado de d'Avila-Levy *et al.* (2015).

Os resultados publicados até o momento sugerem diferentes histórias evolutivas, a depender dos táxons analisados e dos grupos externos utilizados em análises filogenéticas. Além disso, os genes e os métodos de inferência filogenéticos escolhidos também influenciam na análise dos dados (Moreira *et al.*, 2004; Deschamps *et al.*, 2011). Durante muito tempo, a hipótese mais aceita sustentava que um ancestral de vida livre (bodonídeo) teria sido ingerido por um inseto e se adaptado ao seu ambiente intestinal, originando assim os tripanossomatídeos monoxênicos. A partir da conquista da hematofagia, os insetos passaram a inocular estes monoxênicos ocasionalmente em vertebrados durante o repasto sanguíneo. A evolução no parasitismo heteroxênico possivelmente teria surgido a partir de um ancestral de *Leishmania* parasitando um inseto hematófago e assim teria sido inoculado em um hospedeiro vertebrado (Flegontov *et al.*, 2013). Aqueles que conseguiram se adaptar ao novo ambiente passaram a circular entre vertebrados e insetos hematófagos, dando origem as espécies heteroxênicas (Stevens *et al.*, 2001, 2008; Maslov *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Lukeš *et al.*, 2002, 2014; Simpson *et al.*, 2006; Yurchenko *et al.*, 2006; Kraeva *et al.*, 2015). Uma hipótese parecida é

aceita para origem dos tripanossomatídeos de planta, porém esta transição teria sido feita através de insetos fitófagos (Maslov *et al.*, 2013). Atualmente, sugeriu-se que a nova espécie *Paratrypanosoma confusum*, isolado do intestino das fêmeas de *Culex pipiens* (Diptera), constitui o ramo mais basal da história evolutiva dos tripanossomatídeos, sendo o elo entre os ancestrais bodonídeos de vida livre e as espécies parasitas obrigatórias (Flegontov *et al.*, 2013).

Em relação a taxonomia, tradicionalmente, os membros da família Trypanosomatidae foram classificados de acordo com parâmetros morfológicos, ciclo de vida, hospedeiro de isolamento e manifestação clínica, quando aplicável. Essas ferramentas taxonômicas tradicionais foram fundamentais para Hoare e Wallace determinarem os primeiros gêneros de tripanossomatídeos monoxênicos conhecidos: *Crithidia*, *Leptomonas*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* (Hoare & Wallace, 1966; Wallace, 1966; Vickerman, 1976; Voltýpka *et al.*, 2015). A utilização de dados moleculares em estudos taxonômicos e filogenéticos desses organismos mostrou que a classificação fundamentada unicamente em caracteres morfológicos e ciclos de vida não refletia a diversidade taxonômica e as relações evolutivas do grupo, e isso possibilitou a reclassificação de alguns gêneros e espécies dentro da família (Tabela 1) (Yurchenko *et al.*, 2006, 2014; Teixeira *et al.*, 2011; Borghesan *et al.*, 2013; Kostygov *et al.*, 2014; Votýpka *et al.*, 2014; Schwarz *et al.*, 2015).

Tabela 1- Espécies de tripanossomatídeos que tiveram sua taxonomia revista ao longo dos anos. A Coluna da esquerda apresenta as descrições originais das espécies enquanto que a coluna da direita mostra a nomenclatura revisada após análises moleculares.

ORIGINAL	ATUALIZADA
<i>Herpetomonas roitmani</i>	<i>Angomonas deanei</i>
<i>Crithidia deanei</i>	
<i>Crithidia desouzai</i>	<i>Angomonas desouzai</i>
<i>Crithidia oncopelti</i>	<i>Strigomonas oncopelti</i>
<i>Blastocrithidia culicis</i>	<i>Strigomonas culicis</i>
<i>Leptomonas samueli</i>	<i>Herpetomonas samueli</i>
<i>Herpetomonas megaselie</i>	<i>Herpetomonas muscarum</i>
<i>Phytomonas davidi</i>	
<i>Leptomonas mirabilis</i>	<i>Herpetomonas mirabilis</i>
<i>Leptomonas costoris</i>	<i>Herpetomonas costoris</i>
<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	<i>Lafontella mariadeanei</i>
<i>Wallaceina brevicula</i>	<i>Crithidia brevicula</i>
<i>Leptomonas collosoma</i>	<i>Wallacemonas collosoma</i>

A escolha de uma abordagem integrativa que une a taxonomia clássica e ferramentas de biologia molecular tem se mostrado o conjunto ideal para o estudo de microorganismos. Essa nova abordagem tem possibilitado a descrição e re-descrição de novos gêneros e espécies da família (Merzlyak *et al.*, 2001; Svobodová *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2011; Wheeler *et al.*, 2013; Borghesan *et al.*, 2013; Flengotov *et al.*, 2013; Votýpka *et al.*, 2013, 2014; Yurchenko *et al.*, 2016). Atualmente, 18 gêneros de tripanossomatídeos são reconhecidos e distribuídos da seguinte forma: Três gêneros heteroxênicos, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que abrigam os parasitas de insetos e vertebrados de importância médica e veterinária; o gênero *Phytomonas*, que abriga as espécies de heteroxênicos parasitas de insetos e plantas; e por último, os 16 gêneros descritos como monoxênicos: *Crithidia*, *Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Sergeia*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Blechomonas*, *Paratrypanosoma*, *Wallacemonas*, *Kentomonas*, *Lotmaria*, *Lafontella*, *Jaeninomonas* e *Novymonas* (Wallace, 1966; Vickerman, 1976; Wallace, 1979 Wallace *et al.*, 1983; Camargo, 1999; 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).

Enquanto os gêneros de tripanossomatídeos heteroxênicos são amplamente estudados por serem patogênicos aos vertebrados, as espécies não patogênicas recebem uma atenção consideravelmente menor por serem parasitas *a priori* exclusivos de insetos e plantas. Apesar de serem as espécies mais abundantes na família, pouco se conhece proporcionalmente a respeito da bioquímica, biologia celular e genética dos tripanossomatídeos monoxênicos. Dada a diversidade de espécies conhecidas de insetos e plantas que são prováveis hospedeiros, acredita-se que a biodiversidade desses parasitas ainda esteja subestimada (Podlipaev, 2001; Westenberger *et al.*, 2004; d'Avila-Levy *et al.*, 2015). É importante salientar que as espécies tipicamente não patogênicas ao Homem são importantes modelos de estudo para a compreensão do comportamento biológico, bioquímico e molecular dos tripanossomatídeos patogênicos (d'Avila-Levy *et al.*, 2015). Além disso, esses organismos podem ser usados para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo, *Phytomonas serpens* confere imunidade protetora contra o *Trypanosoma cruzi* (Pinge-Filho *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2013). Flagelados da família Trypanosomatidae também podem ser utilizados como plataforma para a produção de proteínas eucarióticas, como por exemplo, a eritropoietina e insulina produzida por *Leishmania tarentolae* (Dortay, 2010).

Embora sejam tradicionalmente descritos como não patogênicos, tripanossomatídeos *a priori* exclusivos de insetos, têm sido reportados causando lesões cutâneas e viscerais em pacientes HIV positivos (Dedet *et al.*, 1995; Pacheco *et al.*, 1998; Chicharro & Alvar, 2003; Jimenez *et al.*, 1996; Morio *et al.*, 2008). Apesar de pacientes imunocomprometidos estarem mais propensos a infecções oportunistas, já existem relatos na literatura, ainda que raros, desses organismos em pacientes saudáveis (Boisseau-Garsaud, 2000), o que contraria o preceito teórico de não patogenicidade. Além disso, tripanossomatídeos monoxênicos estão sendo repetidamente reportados na co-infecção com espécies de *Leishmania* em lesões cutâneas e viscerais, sendo a maioria dos relatos no subcontinente indiano (Srivastava *et al.*, 2010; Sundar *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2012; Ahuja *et al.*, 2015).

### **1.3. Proposta das subfamílias Leishmaniinae, Blechomonadinae, Strigomonadinae e Phytomonadinae**

Em 2001, Merzlyak e colaboradores sugeriram uma nova classificação da família Trypanosomatidae baseados nas análises de sequência da subunidade menor do gene ribossomal (SSUrRNA). Análises deste gene mostravam baixas taxas de divergência entre os organismos analisados e este grupo foi denominado como clado *Slowly Evolving* (SE, do inglês “de evolução lenta”) (Merzlyak *et al.*, 2001). Análises filogenéticas recentes tanto com a subunidade menor do gene ribossomal (SSUrRNA) quanto com o gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) revelaram um clado monofilético dentro da família Trypanosomatidae, com altos valores de *bootstrap*. Isto fez com que pesquisadores sugerissem a criação da Subfamília Leishmaniinae (Merzlyak *et al.*, 2001; Yurchenko *et al.*, 2006; Maslov *et al.*, 2010; Jirků *et al.*, 2012), que inclui os gêneros heteroxênicos *Leishmania* e *Endotrypanum*, observado como um clado monofilético e os gêneros *Wallaceina*, *Crithidia* e *Leptomonas* que se mostraram polifiléticos e apresentam-se de forma intercalada dentro do clado, confirmando a necessidade de revisão desses gêneros (Jirků *et al.*, 2012). O gênero *Wallaceina* é observado entre os gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* na árvore filogenética. Em 2014, Kostigov e colaboradores propuseram uma revisão desse gênero e as espécies *Wallaceina brevicula* e *Wallaceina inconstans* foram realocadas no gênero *Crithidia* e sinonimizadas em *Crithidia brevicula* (Kostigov *et al.*, 2014) (Figura 3).

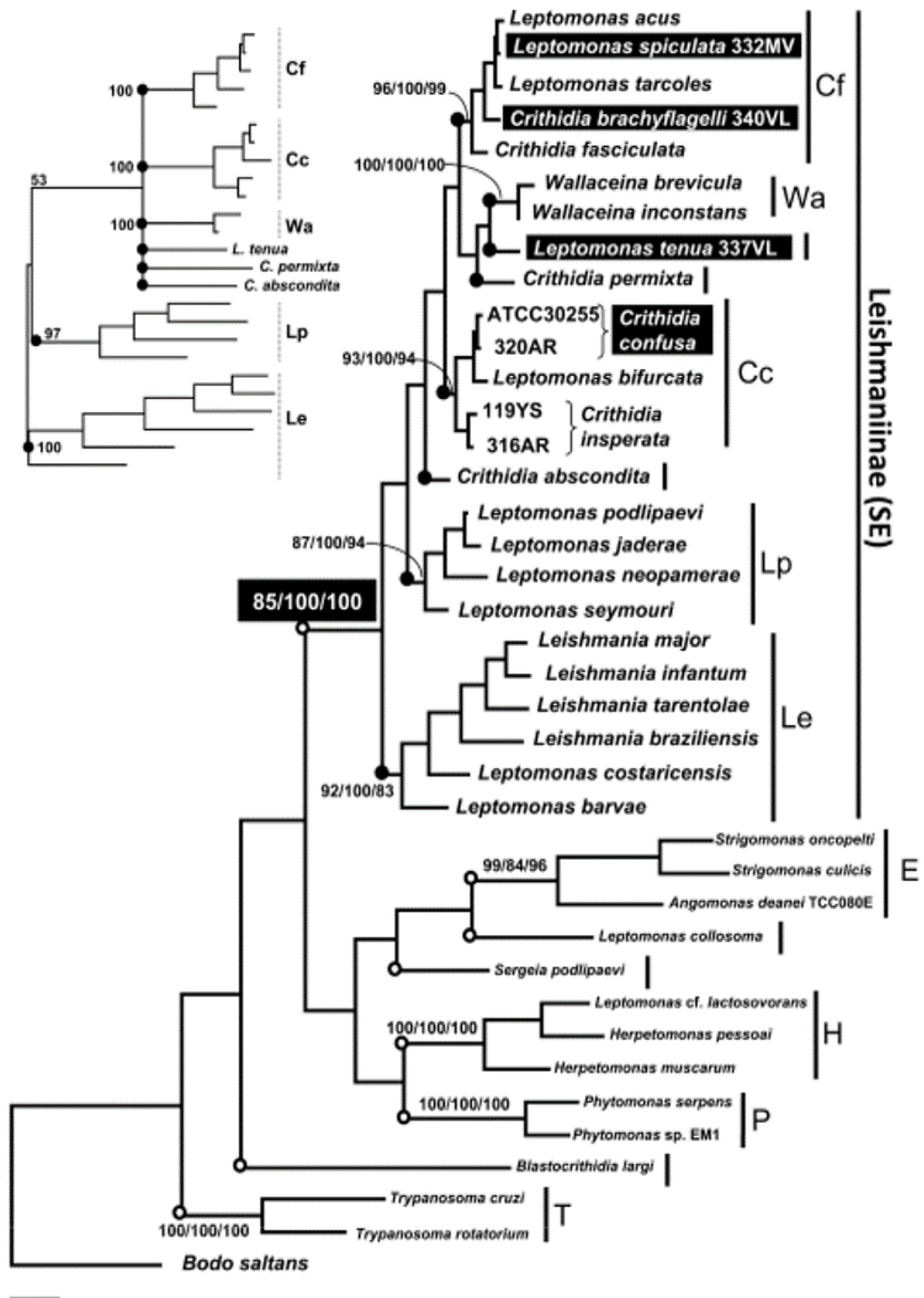


Figura 3- Árvore filogenética da família Trypanosomatidae proposto por Jirků e colaboradores (2012), enfatizando a posição das espécies dentro da nova subfamília Leishmaniinae (anteriormente denominado clado “slowly evolving”). A árvore foi inferida a partir da concatenação dos genes gGAPDH e SSUrRNA de 39 espécies selecionadas.

Posteriormente, foi proposta a criação de uma nova subfamília dentre os tripanossomatídeos (Votýpka *et al.*, 2013). A classificação abriga espécimes isolados do trato digestivo de pulgas da ordem Siphonaptera, coletadas sobre mamíferos, pássaros e morcegos em diferentes localidades na República Tcheca. Foi possível observar uma grande diversidade de isolados a partir das análises das sequências dos genes Spliced Leader (SL), gGAPDH e SSUrRNA: uma nova espécie do gênero *Trypanosoma*, duas espécies de tripanossomatídeos ainda não identificados na subfamília Leishmaniinae, duas espécies do gênero *Herpetomonas* e 11 espécies que se agrupavam em um novo clado na árvore filogenética das espécies de tripanossomatídeos. Este clado foi classificado como um novo gênero (*Blechromonas*), que atualmente conta com 11 espécies descritas. Além da sugestão do gênero, pela posição do clado foi sugerido também a criação de uma nova subfamília dentro da família Trypanosomatidae: Blechomonadinae (Votýpka *et al.*, 2013) (Figura 4).

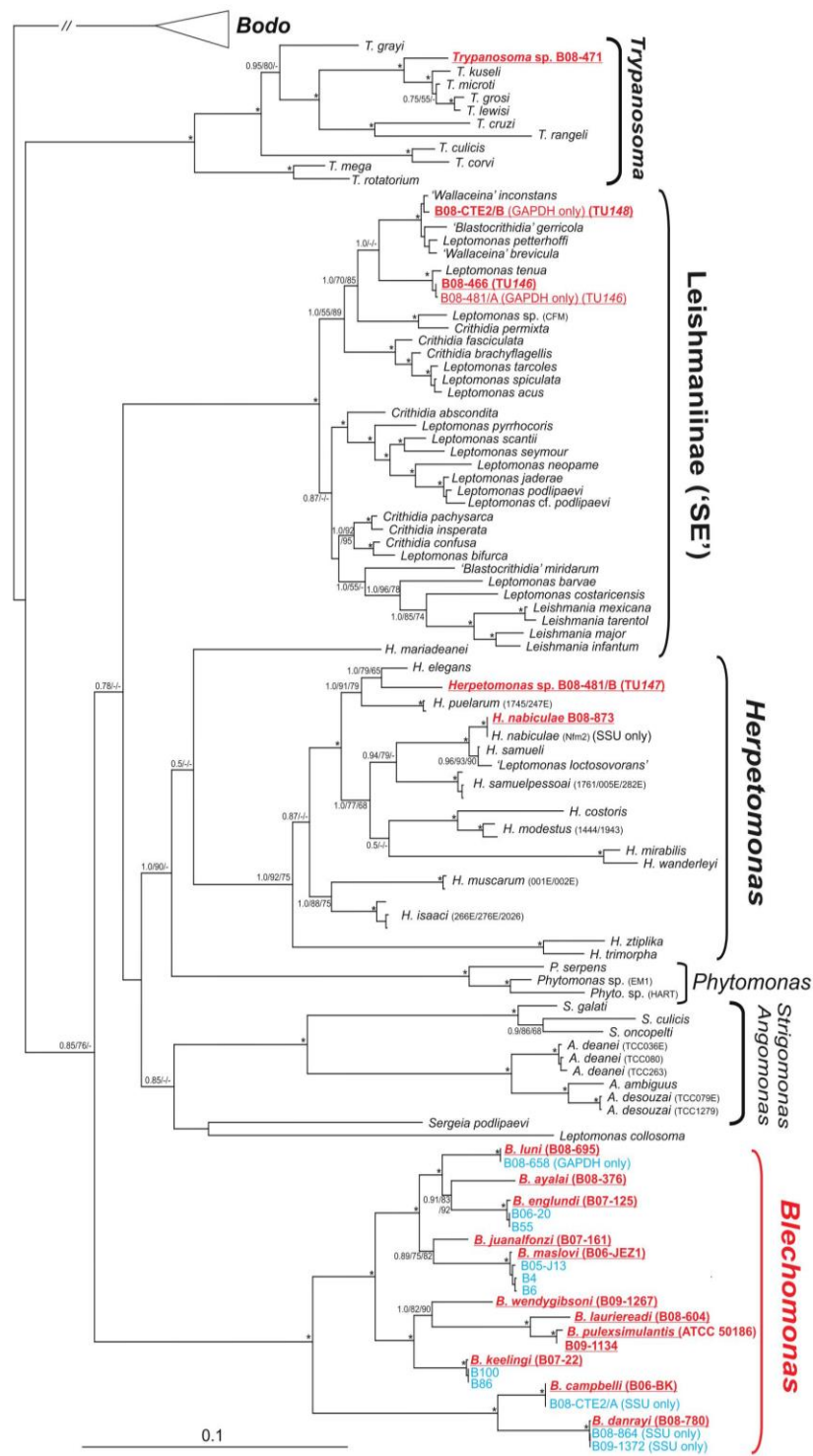


Figura 4- Árvore filogenética da família Trypanosomatidae baseada na análise sequências concatenadas dos genes gGAPDH e SSUrRNA. Observa-se em vermelho os espécimes isolados e identificados na família Trypanosomatidae. Em vermelho: o clado da nova subfamília Blechomonadinae e suas 11 espécies descritas. Retirado de: Votýpka *et al.*, 2013



A subfamília Strigomonadinae foi sugerida por Votýpka e colaboradores (2014) para agrupar principalmente os tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes: *Strigomonas*, *Angomonas* e *Kentomonas* (Figura 5). Além desta sinapomorfia, os membros desta subfamília também compartilham outras características em comum como um cinetoplasto comprido e uma haste paraflagelar rudimentar.

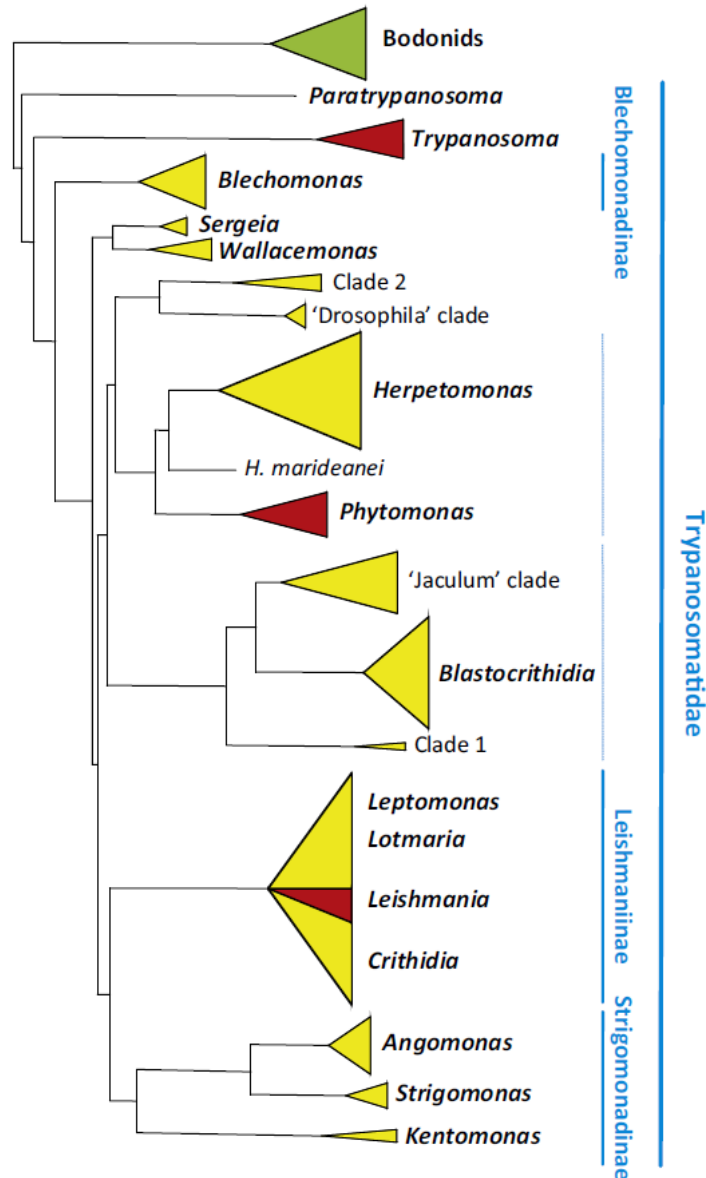


Figura 5- Árvore filogenética da família Trypanosomatidae baseada na análise sequências do gene SSUrRNA. Observa-se as relações evolutivas entre os tripanossomatídeos. Na cor verde estão representadas as espécies de Bodonídeos, usadas como grupo externo. Em amarelo os parasitas monoxênicos, exclusivos de hospedeiros invertebrados. Em vermelho estão representadas as espécies de tripanossomatídeos heteroxênicos. Na imagem é possível observar as três subfamílias reconhecidas: Blechomonadinae, Leishmaniinae e Strigomonadinae. Fonte: Votýpka *et al.*, 2014.

Recentemente, a subfamília Phytomonadinae foi proposta por Yurchenko e colaboradores (2016) para alocar espécies dos gêneros *Phytomonas*, *Herpetomonas* e *Lafontella*, gênero sugerido para redescricao da espécie *Herpetomonas mariadeanei* (Figura 6). Os autores discutem a relação estreita entre os gêneros e, apesar de apenas o gênero *Phytomonas* ser considerado heteroxênico, algumas espécies de *Herpetomonas* também já foram isoladas de plantas. Acredita-se que os flagelados de plantas tenham tido sua origem a partir do gênero *Herpetomonas* que, ao explorarem um novo habitat, se adaptaram a ele e passaram a alternar entre insetos e plantas. Uma observação interessante feita pelos autores é de que as espécies *Herpetomonas wanderleyi* e *Herpetomonas mirabilis* sejam as espécies mais próximas do gênero *Phytomonas*, por apresentarem o corpo celular mais alongado e às vezes contorcido (Borghesan *et al.*, 2013), característico do gênero *Phytomonas*. Adicionalmente, é possível observar ainda uma posição mais próxima na árvore filogenética entre os gêneros (Yurchenko *et al.*, 2016). Além das características filogenéticas e morfológicas, os membros dessa nova subfamília compartilham outras características em comum, como por exemplo a ausência da enzima arginase (Camargo *et al.* 1978, 1987; Yoshida e Camargo 1978), responsável por catalisar o final do ciclo da uréia (Wu e Morris, 1998).

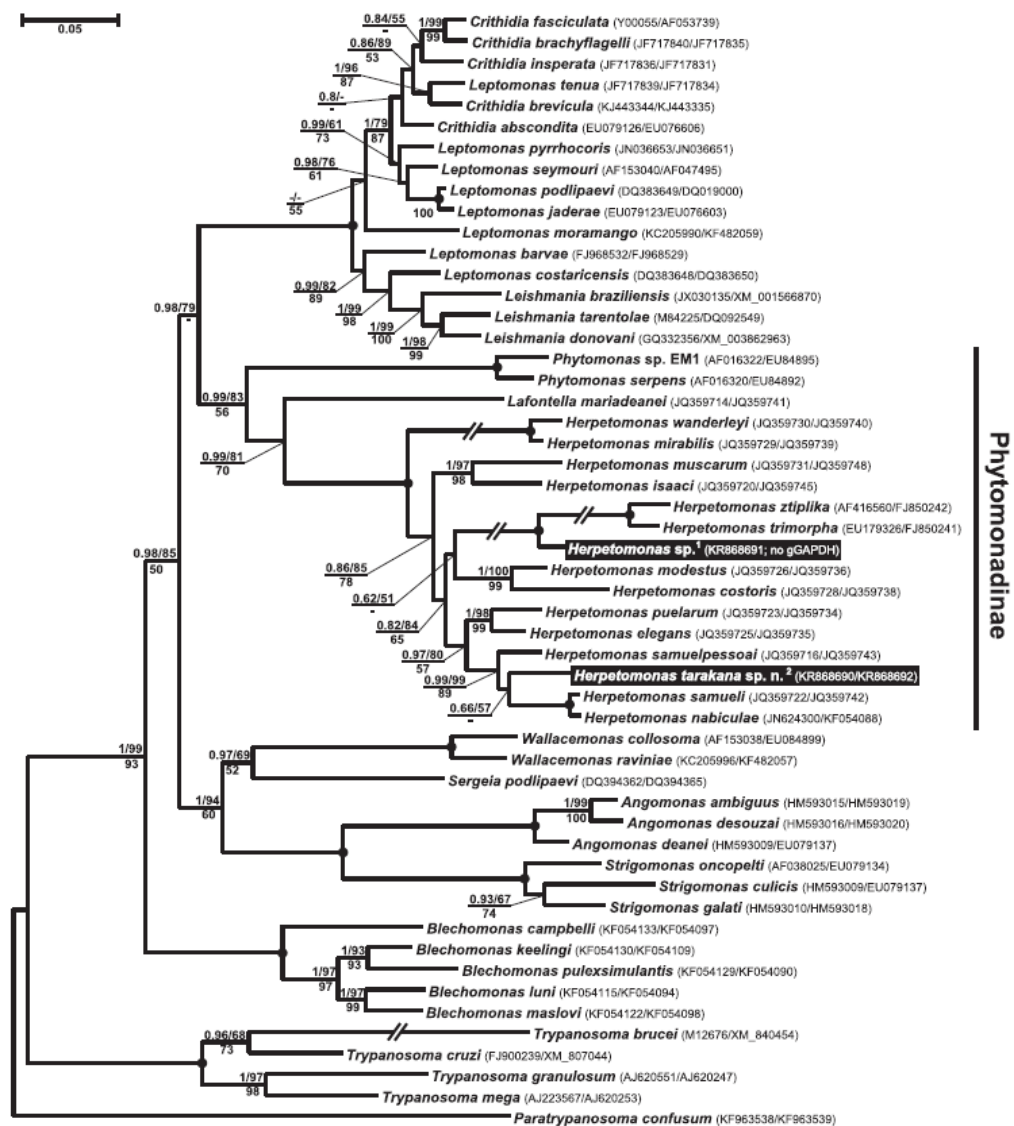


Figura 6- Árvore filogenética da família Trypanosomatidae baseada na análise concatenada das sequências dos genes SSUrRNA e gGAPDH. Observa-se as relações evolutivas entre os tripanossomatídeos e a nova subfamília Phytomonadinae. Fonte: Yurchenko *et al.*, 2016.

É importante salientar que a taxonomia da família Trypanosomatidae está em constante revisão e os gêneros *Wallacemonas*, *Trypanosoma*, *Blastocrithidia*, *Sergeia*, *Rhynchoidomonas*, *Paratrypanosoma*, *Jaenimonas* e *Novymonas* ainda não foram distribuídos em subfamílias.

## 2. Taxonomia de tripanossomatídeos de insetos e plantas

Ainda hoje, a diversidade de tripanossomatídeos tradicionalmente não patogênicos é subestimada. Em 1990, Podlipaev publicou um catálogo com a descrição de aproximadamente 350 espécies de tripanossomatídeos monoxênicos e de planta. Os gêneros atualmente descritos de tripanossomatídeos de insetos e plantas estão detalhados abaixo.

### 2.1. Tripanossomatídeos que albergam simbiosites: *Angomonas*, *Strigomonas* (Teixeira *et al.*, 2011) e *Kentomonas* (Votýpka *et al.*, 2014)

Segundo o contexto histórico, cinco espécies de tripanossomatídeos monoxênicos que apresentavam bactérias endossimbiontes no citoplasma foram descritas: *Blastocrithidia culicis* (Chang, 1975), *Crithidia oncopelti* (Gill & Vogel, 1963), *Crithidia deanei* (Carvalho, 1973), *Crithidia desouzai* e *Herpetomonas roitmani* (Fiorini *et al.* 1989; Faria e Silva *et al.* 1991; Motta *et al.*, 1991). Além de possuírem uma bactéria endossimbiótica em seu interior (o que não ocorre nas outras espécies desses gêneros), estas espécies apresentavam diferenças morfológicas, moleculares e bioquímicas (Camargo *et al.*, 1982, 1992; Teixeira *et al.*, 1995; Maslov *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1997; Hollar *et al.*, 1998; Brandão *et al.*, 2000; Merzlyak *et al.*, 2001; d'Avila-Levy *et al.*, 2001, 2004; Merzlyak *et al.*, 2010). Brandão e colaboradores (2000) mostraram que as espécies *Crithidia deanei*, *Crithidia desouzai*, *Crithidia oncopelti* e *Herpetomonas roitmani* apresentam o tamanho do minicírculo do kDNA consideravelmente diferente de outras espécies de *Crithidia*, que exibem a forma coanomastigota. Os autores observaram a heterogeneidade do gênero e sugeriram que este fosse dividido em dois grupos: (i) *Angomonas*, que inclui as espécies *C. deanei*, *C. desouzai* e *H. roitmani*; (ii) *Strigomonas* que aloca a espécie *C. oncopelti*. Todas estas espécies realocadas apresentavam bactérias endossimbióticas em seus citoplasmas. Entretanto, diversas espécies de do gênero *Crithidia* não se encaixavam nesses grupos (Brandão *et al.*, 2000). Mais tarde, d'Avila-Levy e colaboradores (2004) corroboraram a existência dos dois grupos, com base em análise de perfis de glicoproteínas das espécies.

Posteriormente, Teixeira e colaboradores (2011) publicaram uma revisão completa das espécies que apresentam endossimbionte e validaram os gêneros *Angomonas* e *Strigomonas*. Através de uma metodologia análoga ao DNA *Barcoding* (do inglês “Código de Barras de DNA”) utilizando a região V7/V8 da subunidade menor do RNAr, além das análises filogenéticas com os alvos moleculares gGAPDH, SSUrRNA e ITS, os autores descreveram os dois grupos: o gênero *Angomonas* que abriga as espécies de *C. desouzai*, reclassificada como

*A. desouzai*, e *C. deanei*, reclassificada como *A. deanei*, além de *H. roitmani* em uma cepa de *A. deanei*; e o gênero *Strigomonas*, composto pelas espécies anteriormente descritas como *Blastocrithidia culicis* e *C. oncopelti*. Dois novos isolados de *Lutzomyia almerioi* e *Chrysomya albiceps* (Diptera) coletados em Mato Grosso do Sul (Brasil), foram descritos como novas espécies dos gêneros recém validados: *Strigomonas galati* e *Angomonas ambiguus*, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011).

Durante a revisão dos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas*, os autores fizeram um estudo detalhado da filogenética das bactérias endossimbióticas encontradas em todas as espécies descritas no trabalho. As análises filogenéticas permitiram observar que estes simbiossomas formavam dois grupos diferentes, em consonância com o gênero em que se encontravam. Ou seja, foi possível identificar o endossimbionte como *Candidatus* (classificação taxonômica para os organismos não cultiváveis (Murray *et Stackebrandt* 1995)) do gênero *Kinetoplastibacterium* e a espécie foi descrita de acordo com o hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2011).

Votýpka e colaboradores (2014) descreveram um novo gênero de tripanossomatídeo, isolado de *Sarcophaga* sp. (Diptera), coletado na província de Sorsogon (Filipinas). O flagelado foi descrito como *Kentomonas* e apenas uma espécie foi identificada: *Kentomonas sorsogonicus*. Esta espécie apresenta um endossimbionte, que assim como os endossimbiontes, *Candidatus Kinetoplastibacterium*. No entanto, as análises dos genes 16S e ITS permitiram a identificação de uma espécie distinta das descritas por Teixeira e colaboradores. Além das diferenças entre os simbiossomas desses gêneros, *Kentomonas*, *Angomonas* e *Strigomonas* formam clados monofiléticos e distintos entre si, a partir da análise dos genes SSUrRNA, gGAPDH e ITS. Ainda foi possível observar características morfológicas particulares como por exemplo a presença de sulcos na superfície celular do parasito. Em conjunto, essas diferenças sustentam a descrição do novo gênero *Kentomonas*. (Votýpka *et al.*, 2014).

## **2.2. *Novymonas* (Kostygov *et al.*, 2016)**

Recentemente, Kostigov e colaboradores (2016) descreveram um flagelado isolado do intestino de *Niesthrea vincentii* (Hemiptera) coletado no Equador em 2008 como um novo gênero: *Novymonas*. O gênero conta apenas com uma espécie descrita, *Novymonas esmeraldas*, e apresenta um endossimbionte. Diferente dos outros tripanossomatídeos que contém endossimbionte, *N. esmeraldas* apresenta uma bactéria totalmente inédita

encontrada nesses organismos e descrita como uma nova espécie através da análise do gene 16S: *Candidatus Pandoraea novymonadis*. Além da diferença entre as espécies de endossimbionte, a partir da análise filogenética de tripanossomatídeos com base nos genes 18S ribossomal RNA (subunidade menor), 28S ribossomal RNA (subunidade maior) e Proteína de choque térmico 83 (Hsp83) foi possível observar a separação dessa espécie em um clado distinto daqueles compostos por espécies de outros gêneros conhecidos da família Leishmaniinae. Também é importante ressaltar que os autores observaram uma relação endossimbiótica completamente díspar das já observadas em tripanossomatídeos: a bactéria preserva a parede celular no interior de seus hospedeiros; não há uma coordenação da divisão celular da bactéria com o hospedeiro, e isso resulta em um número elevado de bactérias por células; o endossimbionte de *Novymonas*, diferente de qualquer outro endossimbionte já descrito em tripanossomatídeos, é cultivado em culturas axênicas, o que demonstra uma independência na relação entre endossimbionte- hospedeiro (Kostigov *et al.*, 2016). Por representarem um novo tripanossomatídeo, com características totalmente distintas das espécies descritas que albergam endossimbionte, *Novymonas* não deve ser considerada na mesma subfamília das espécies já descritas de *Angomonas*, *Strigomonas* e *Kentomonas*.

### 2.3. *Crithidia* (Léger, 1902)

A espécie-tipo do gênero *Crithidia* é a *Crithidia fasciculata* (Léger, 1902), tendo sido caracterizada inicialmente como um tripanossomatídeo de insetos, encontrado em diversos hospedeiros, tanto predadores quanto fitófagos, e que apresentava formas coanomastigotas em seu ciclo de vida (Hoare & Wallace, 1966; Wallace, 1966; Camargo 1992) (Figura 2). Esta forma é descrita apresentando um formato arredondado (semelhante a uma pêra), flagelo curto e cinetoplasto anterior ao núcleo.

Análises filogenéticas recentes fundamentadas em sequências de DNA revelaram que o gênero *Crithidia* é polifilético (Teixeira *et al.*, 2011; Yurchenko *et al.*, 2014), o que chamou a atenção da comunidade científica, e tem suscitado estudos de revisão taxonômica do grupo. Atualmente, fazem parte do cenário de revisão taxonômica as espécies *Crithidia deanei* e *Crithidia desouzai*, que foram reclassificadas no gênero *Angomonas* e *Crithidia oncopelti*, reclassificada no gênero *Strigomonas* (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; Kostigov *et al.*, 2014). O

gênero tem novas espécies sendo frequentemente descritas, isoladas de diferentes hospedeiros e em diversas localidades (Léger 1902; Hanson, 1961; Langridge 1967; Yourth *et al.*, 2006; Yurchenko *et al.*, 2008, 2009, 2014; Schmid-Hempel *et al.*, 2010; Jirků *et al.*, 2012; Kostygov *et al.*, 2014; Runckel *et al.*, 2014; Schwarz *et al.*, 2015).

#### **2.4. *Herpetomonas* (Kent, 1880)**

O gênero *Herpetomonas*, que tem como espécie-tipo *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) e é composto por tripanossomatídeos monoxênicos que apresentam formas promastigotas e opistomastigotas (Figura 2). Entretanto, essa última forma é raramente vista em insetos e até mesmo em cultura. Por outro lado, as formas promastigotas podem ser observadas em outros gêneros, como *Leptomonas* e *Phytomonas*, gerando ambiguidades na classificação taxonômica do gênero *Herpetomonas*, principalmente na época em que somente a taxonomia clássica era realizada (Teixeira *et al.*, 1997; Borghesan *et al.*, 2013).

Os tripanossomatídeos desse gênero podem ser encontrados em diversas espécies de insetos das ordens Diptera e Hemiptera e também em algumas espécies de plantas (Teixeira *et al.*, 1996; Fiorini *et al.*, 2001; Borghesan *et al.*, 2013). Além destes hospedeiros, isolados deste gênero têm se tornado de grande importância médica devido a isolados encontrados em pacientes infectados com HIV, apresentando um aspecto clínico semelhante aos ocasionados por parasitos do gênero *Leishmania* (revisto por Chicharro & Alvar, 2003).

Assim como aconteceu com o gênero *Crithidia*, análises filogenéticas baseadas em dados genômicos revelaram que o gênero *Herpetomonas* também é polifilético (Teixeira *et al.*, 1997; Borghesan *et al.*, 2013), e da mesma forma, a taxonomia desse grupo tem sido revisada. Além da constante descrição de novas espécies, algumas espécies já descritas foram realocadas neste gênero, como é o caso de *Leptomonas samueli* e *Leptomonas costoris* (Borghesan *et al.*, 2013). Outras espécies validadas como *Herpetomonas* passaram por reclassificações e foram agrupadas em outros gêneros de acordo com análises filogenéticas (Borghesan *et al.*, 2013).

#### **2.5. *Leptomonas* (Kent, 1808)**

O gênero *Leptomonas* tem como espécie-tipo *Leptomonas seymouri* (Wallace, 1977), e apresenta diversos hospedeiros invertebrados, que incluem nematódeos, moluscos, rotíferos e insetos. Durante muito tempo, utilizou-se como parâmetro para identificação do gênero, além do ciclo de vida

monoxênico, a presença exclusiva de formas promastigotas (Figura 2). Análises filogenéticas atuais mostram que o grupo é polifilético e diversos táxons foram nomeados indistintamente como *Leptomonas* (Kolesnikov *et al.*, 1990; Camargo *et al.*, 1992), assim como ocorrera com *Crithidia* (Yurchenko *et al.*, 2008, 2009; Jirků *et al.*, 2012; Kostygov *et al.*, 2014) e *Herpetomonas* antes da revisão taxonômica (Borghesan *et al.* 2013). Existem algumas espécies do gênero que são filogeneticamente mais próximas às espécies de *Crithidia* e outras que claramente estão mais relacionadas com espécies de *Leishmania* (Yurchenko *et al.*, 2006, 2008, 2009; Maslov *et al.*, 2010; Jirků *et al.*, 2012; Votýpka *et al.*, 2012, 2013). Algumas espécies também já foram reclassificadas como *Herpetomonas* (Borghesan *et al.*, 2013). Tendo isso em vista, é evidente a necessidade de revisão do gênero.

## **2.6. *Phytomonas* (Donovan, 1909)**

O gênero *Phytomonas* apresenta insetos fitófagos e plantas como hospedeiros e, por essa razão, é o único grupo de heteroxênico abordado nesse trabalho.

O primeiro relato de Tripanossomatídeos em plantas aconteceu em 1909 pelo pesquisador francês Alexandre Lafont. Há relatos históricos de que Lafont estudava as propriedades medicinais da planta *Euphorbia pilulifera* (Malpighiales) como possível tratamento para a “surra”, doença causada em animais domésticos e selvagens pelo protozoário *Trypanosoma evansi*. Devido a conversas pessoais com outros pesquisadores que sugeriram que o látex de plantas poderia ser um meio de cultura viável de espécies do gênero *Trypanosoma*, Lafont solicitou a seu técnico, Sr. Davi, que examinasse o látex de Eufórbias por meio de microscopia. As observações do técnico permitiram o isolamento de um flagelado. Como apenas os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Herpetomonas*, *Crithidia* e *Leptomonas* eram descritos na época, Lafont chamou o novo flagelado de *Leptomonas davidi* (Lafont, 1909 *apud* Camargo, 1999).

O gênero *Phytomonas* foi proposto por Donovan (1909) para acolher a descrição de diversos flagelados isolados de plantas depois da descoberta de Lafont. No entanto, pesquisadores da época não adotaram a nova nomenclatura. A primeira espécie de *Phytomonas* foi descrita apenas 20 anos depois e recebeu o nome de *Phytomonas francai* (Aragão, 1927), espécie tipo do gênero. Foi apenas na década de 70 que o gênero *Phytomonas* teve a aceitação da comunidade científica (Jankevicius *et al.*, 1988), e a partir de então, os isolados obtidos de plantas e que apresentavam a forma promastigota em cultura foram



associados ao gênero *Phytomonas* (Vickerman, 1976). Entretanto, é sabido que não apenas este gênero pode ser encontrado parasitando plantas, já havendo relato da presença de *Leptomonas*, *Crithidia* e *Herpetomonas* ocasionalmente nesta classe de hospedeiro (Conchon 1989; Teixeira *et al.*, 1996; Camargo, 1999; Serrano *et al.*, 1999).

Assim como aconteceu para outros tripanossomatídeos, a distinção entre as espécies encontradas em plantas só foi possível a partir da utilização de ferramentas moleculares. O gênero *Phytomonas* constitui um clado monofilético e atualmente apresenta apenas três espécies descritas (Dollet *et al.* 2012; Maslov *et al.* 2013; Sturm *et al.* 2007; Frolov *et al.* 2016).

### **2.7. *Wallacemonas* (Kostygov et Yurchenko, 2014)**

O gênero descrito como *Wallaceina* foi criado para albergar uma espécie (*Wallaceina inconstans*) que apresentava formas coanomastigota (Figura 2) e endomastigota e que fora previamente descrita como *Crithidia brevicula* (Frolov *et Malysheva*, 1989). Posteriormente, sete espécies foram descritas como pertencentes ao gênero *Wallaceina* a partir de formas endomastigotas em cultura. Em 2014, Yurchenko e colaboradores sugeriram a redefinição do gênero *Wallaceina*. Análises filogéticas com base nos genes 18S, gGAPDH e SL mostraram que o gênero era polifilético, e se dividia em dois clados distintos. Um dos clados, contendo quatro dessas espécies, estava associado à subfamília Leishmaniinae (Podlipaev *et al.*, 2004; Yurchenko *et al.*, 2014). No mesmo ano, um outro grupo de pesquisadores também propôs a revisão do gênero *Wallaceina* (Kostygov *et al.*, 2014). Os autores concluíram que as espécies que compunham o clado pertencente a subfamília Leishmaniinae eram, na verdade, apenas isolados de uma mesma espécie, sem relação com as outras espécies descritas no gênero. Sendo assim, sugeriram que estas quatro espécies fossem sinonimizadas e renomeadas em *C. brevicula*, nome original do grupo (Kostygov *et al.*, 2014). Além disso, os autores também sugerem que o nome *Wallaceina* seja abolido e as três espécies que permaneceram no gênero sejam realocadas em um novo gênero, nomeado *Wallacemonas*. Este gênero tem como espécie-tipo *Wallacemonas colossoma* (Kostygov *et al.*, 2014).

### **2.8. *Lotmaria* (Evans et Schwarz, 2014)**

Gênero criado para acomodar uma espécie isolada do íleo de *Apis mellifera* (abelha) que apresenta a forma coanomastigota, mas que é filogeneticamente distinta de outra espécie isolada do mesmo hospedeiro,

*Crithidia mellificae*. *Lotmaria passim* é a espécie-tipo e única representante do gênero (Schwarz *et al.*, 2015).

### **2.9. *Lafontella* (Kostygov *et Yurchenko*, 2015)**

O gênero foi criado recentemente para melhor descrever a espécie *Herpetomonas mariadeanei* (Yoshida, 1978). Análises filogenéticas mostraram que esta espécie não agrupa com nenhuma espécie do gênero *Herpetomonas* e nem outro gênero conhecido. Apresenta formas promastigota, opistomastigota e endomastigota (Figura 2). Atualmente tem uma única espécie descrita: *Lafontella mariadeanei*, que é a espécie-tipo do gênero (Yurchenko *et al.*, 2016).

### **2.10. *Rhynchoidomonas* (Patton, 1910)**

O gênero *Rhynchoidomonas*, que tem como espécie-tipo *Rhynchoidomonas luciliae* foi primeiramente descrito por Patton (1910) para alocar tripanossomatídeos que apresentam formas tripomastigotas com membrana ondulante isolados de insetos das ordens Lepidoptera e Diptera. Wallace (1966) descreveu seis espécies para o gênero *Rhynchoidomonas* e Page e colaboradores (1986) publicaram a última espécie descrita do gênero, isolada de um inseto da ordem Lepidoptera. Esta última descrição, *Rhynchoidomonas operophtherae*, foi baseada apenas em caracteres morfológicos e sua lâmina conservada ainda está depositada no Museu de História Natural de Londres (d'Avila-Levy *et al.*, 2016). Desde então, não houve mais nenhuma descrição de espécies, e alguns autores sugerem que este gênero seja descartado pela ausência de sequências de DNA.

### **2.11. *Sergeia* (Svobodová, 2007)**

O gênero foi descrito a partir de análises filogenéticas com a utilização de ferramentas moleculares e composto apenas de uma única espécie e também espécie-tipo do gênero, *Sergeia podlipaevi*, isolada do intestino do inseto hematófago *Culicoides festivipennis* (Diptera) (Svobodová *et al.*, 2007).

### **2.12. *Blastocrithidia* (Laird, 1959)**

Os tripanossomatídeos do gênero *Blastocrithidia* apresentam a forma epimastigoma predominantemente em seu ciclo de vida, embora seja possível observar outros morfotipos em cultura (Sousa, 1994). Tem como espécie tipo *Blastocrithidia gerridis*, isolada de *Gerris fossarum* (Hemiptera) (Patton 1908;

*apud* Tieszen *et al.*, 1983). Assim como espécies do gênero *Trypanosoma*, o flagelado *Blastocrithidia* também é encontrado infectando triatomíneos, mas diferente de seu parente heteroxênico, *Blastocrithidia* também parasita outros insetos. A espécie *Blastocrithidia triatomae* (Cerisola *et al.*, 1971) é frequentemente encontrada em triatomíneos e estudos já comprovaram a patogenicidade deste flagelado ao hospedeiro, bem como sua competição com *T. cruzi*, podendo ser este um importante candidato ao controle biológico da doença de Chagas (Schaub *et al.*, 1988, 1990). Atualmente, o grupo conta com sete espécies que formam um clado distante e basal dentro da família Trypanosomatidae (Merzlyak *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004, Yurchenko *et al.*, 2008; Maslov *et al.*, 2010; Votýpka *et al.*, 2012).

### **2.13. *Blechomonas* (Votýpka et Suková 2013)**

Gênero descrito por Votýpka e colaboradores (2013) para descrever espécies de monoxênicos que até o momento foram isolados apenas em insetos da ordem Siphonaptera (pulgas). Tem como espécie tipo *Blechomonas ayalai*. Atualmente contam com a descrição de oito novas espécies do gênero, além da redescrição de *Leptomonas pulexsimulantis* em *Blechomonas pulexsimulantis*. Podem apresentar formas coanomastigotas e promastigotas (Fig. 2) e sua descrição foi feita a partir de análises filogenética e morfológica dos isolados.

### **2.14. *Paratrypanosoma* (Votýpka et Lukeš 2013)**

Gênero descrito a partir da observação e isolamento de formas promastigotas no intestino de *Culex pipiens* (Diptera). Tem apenas uma espécie descrita, *Paratrypanosoma confusum*, e atualmente é considerado o elo histórico evolutivo entre os tripanossomatídeos parasitos de insetos e seus ancestrais de vida livre através de análises filogenéticas (Flegontov *et al.*, 2013). A nova espécie *P. confusum* foi isolada a partir de fêmeas mosquitos, o que pode gerar dúvida quanto à classificação em monoxênico da espécie, já que o inseto pode ter adquirido o parasito do hospedeiro vertebrado. Além disso, as análises filogenéticas possibilitaram observar a posição desta espécie entre o clado monofilético dos *Trypanosomas* e o clado do grupo externo, ancestral de vida livre *Bodo saltans*, sendo *P. confusum* mais relacionado aos tripanossomatídeos do que com o grupo ancestral de vida livre. (Flegontov *et al.*, 2013).

## **2.15. *Jaenimonas* (Hamilton, 2015)**

Este novo gênero foi descrito a partir do isolamento de um tripanossomatídeo em *Drosophila* (Diptera). A espécie descrita como *Jaenimonas drosophilae* é a espécie-tipo e foi o primeiro flagelado da família Trypanosomatidae a ser isolado deste grupo de inseto (Hamilton *et al.*, 2015).

### **3. Utilização de genes para as análises taxonômicas e filogenéticas de tripanossomatídeos**

Nas últimas décadas, uma abordagem integrativa entre os parâmetros taxonômicos clássicos e aqueles fundamentados na análise genômica tem se revelado eficiente para a reconstrução da história evolutiva dos diferentes organismos, mas especialmente dos microrganismos.

Com o advento da biologia molecular e o surgimento de técnicas de sequenciamento (Sanger, 1975), automação destas técnicas (Hood, 1987) e mais recentemente as novas metodologias de análise genômica em larga escala (revisto por Shokralla *et al.* 2012) foi possível observar um aumento considerável no conhecimento sobre a biodiversidade.

Diversas sequências de genes vêm sendo utilizadas no estudo da taxonomia e filogenia da família Trypanosomatidae. Dentre os mais utilizados e citados na literatura, em especial na análise taxonômica e filogenética dos tripanossomatídeos exclusivos de insetos e plantas, estão o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA), o gene glicossomal Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), o gene 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). A utilização destes marcadores permite a identificação de espécies em comparação com sequências disponíveis em banco de dados públicos. Entretanto, se não houver disponibilidade da sequência do marcador utilizado e/ ou da espécie analisada, a identificação dependerá das interpretações do pesquisador a partir das reconstruções filogenéticas (d'Avila-Levy *et al.*, 2015).

### **3.1. Genes utilizados para análises taxonômicas dos tripanossomatídeos de insetos e plantas depositados na COLPROT**

#### **3.1.1. O gene Ribossomal**

Atualmente, o gene ribossômico tem sido utilizado como ferramenta na inferência filogenética da família Trypanosomatidae (Vickerman 1994; Merzlyak *et al.*, 2001). Uma das razões que justifica o uso do gene ribossômico como um ótimo marcador em inferências filogenéticas, é que as diferentes regiões das unidades de repetição do DNA ribossomal evoluem em taxas diferentes (Hillis & Dixon, 1991). Ou seja, as regiões de repetição do gene contêm partes conservadas e variáveis (Hillis & Dixon, 1991). A estrutura básica do gene ribossomal é conservada em todos os eucariontes. Os genes de RNA ribossomal são transcritos como 18S (subunidade menor), 5.8S e o 28S (subunidade maior) (Perry, 1976; Dietrich *et al.*, 1993). As subunidades maior e menor são formadas por sequências muito conservadas e separadas por dois espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS2) e um espaçador externo transcrito (ETS) (Hernández *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1993; Mukha *et al.*, 2002).

Em tripanossomatídeos a região análoga ao codificante 28S se divide em dois RNAs maiores (24 $\alpha$  e 24 $\beta$ ) e outras quatro moléculas menores (S1, S2, S4 e S6) (White *et al.*, 1986; Campbell *et al.*, 1987; Hernandez *et al.*, 1988; Dietrich *et al.*, 1993). A subunidade menor (18S) por sua vez, é formada por oito regiões conservadas (U1-U8) e por outras nove regiões altamente variáveis (V1-V9) (Hernández *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1993).

Além dos diferentes níveis de conservação deste gene, o que faz com que este alvo seja bastante utilizado na identificação da família Trypanosomatidae, o gene ribossomal apresenta uma ampla disponibilidade em banco de dados públicos, permitindo a comparação entre sequências depositadas e novas sequências.

##### **3.1.1.1. Região V7V8 SSU RNAr**

A região variável V7V8 SSUrRNA vem sendo amplamente utilizada 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). A região apresenta características importantes na utilização de estudos comparativos, tais como o tamanho do fragmento que facilita a amplificação pela PCR (em tripanossomatídeo pode chegar até 2 mil pares de

base, aproximadamente), a presença de regiões variáveis, flanqueadas por regiões conservadas que auxilia no alinhamento das sequências, além de ter uma grande base de dados de diferentes espécies da família depositadas em bancos públicos de informação genômica, o que permite a comparação entre espécies já descritas e novos isolados.

### **3.1.2. O gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH)**

A GAPDH é uma enzima muito importante no processo da glicólise (reações metabólicas resultando na degradação da glicose ou de outros carboidratos para produção de energia). Na maioria das células eucarióticas, este processo ocorre no citoplasma. No entanto, em cinetoplastídeos esse processo ocorre em organelas especializadas, conhecidas como glicossomos (Fothergill Gilmore & Michels, 1993; Hannaert *et al.*, 1998). Na família Trypanosomatidae, existem dois genes que codificam isoformas glicossomal (gGAPDH) dessa enzima e uma citosólica (cGAPDH) (Michels *et al.*, 1986). É importante salientar que ambas as cópias de GAPDH têm alta similaridade e por ser um gene codificante de proteína com atividade enzimática, o GAPDH apresenta baixa taxa de evolução quando comparado com o gene ribossomal. Além disso, este gene é altamente conservado entre as espécies de tripanossomatídeos, tornando-se um bom marcador no estudo da taxonomia e inferência filogenética (Hamilton *et al.*, 2004, 2005, 2007; Stevens *et al.*, 2008). Diversos trabalhos indicam a concordância na topologia de análises filogenéticas entre os genes gGAPDH e SSUrRNA. (Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Viola *et al.*, 2009; Voltýpka *et al.* 2015; d'Avila-Levy *et al.*, 2015). Assim como o SSUrRNA, o GAPDH também conta com a disponibilidade de vasto número de sequências disponíveis em bancos públicos de sequências.

### **3.1.3. O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI)**

A utilização de sequências curtas de DNA na caracterização rápida e precisa de espécies isoladas é denominado DNA *Barcoding* (Herbert *et al.*, 2003). As regiões do gene mitocondrial Citocromo Oxidase, subunidade I (COI) têm sido amplamente utilizadas como *barcode* para metazoários. Isso porque a mitocôndria, ou cinetoplasto (estruturavelmente equivalente em cinetoplastídeos), são produtoras de energia para célula e têm o seu próprio genoma. Além disso, se apresentam em um elevado número de cópias por célula, taxas de mutação diferentes entre espécies distintas e não sofre recombinação gênica. Devido à

falta de consenso entre pesquisadores de que um único marcador seja capaz de classificar todas as espécies existentes no planeta, principalmente para grupo de microorganismos, tem sido proposto marcadores específicos de acordo com o grupo de estudo, o que se aplica ao estudo de protistas e particularmente a kinetoplastídeos (Pawlowski *et al.* 2012; Voltýpka *et al.* 2015). Apesar de COI parecer separar bem espécies próximas de eucariotos, como alguns tripanossomatídeos (Nassonova *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2010; Kher *et al.*, 2011), estes marcadores têm se mostrado ineficazes na caracterização de espécies de diversos microorganismos (Begerow *et al.*, 2010; Pawlowski *et al.*, 2012; Lebonah *et al.*, 2014).

Devido à dificuldade de amplificação para alguns táxons, COI não apresenta uma biblioteca de sequências robusta em banco de dados, e sua utilização em estudos taxonômicos e filogenéticos está atrelado ao uso de outros marcadores para corroboração (Bueno-Silva, 2012). Nesse sentido, diversos pesquisadores da Fiocruz integraram a iniciativa da Rede Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade (BrBol), iniciando um trabalho pioneiro no estudo desse marcador em protozoários da família Trypanosomatidae, tendo como objetivo máximo a formação de um banco de dados de COI e testar a aplicabilidade do marcador como código-de-barras de DNA para esse grupo de organismos. Os resultados preliminares demonstraram que o marcador é capaz de distinguir espécies e linhagens próximas de tripanossomatídeos (Morelli *et al.*, in prep.).

#### **4. 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 espécime depositado (procedência, ano de coleta, identificação, localização geográfica, etc.). Atualmente, as coleções biológicas são uma das principais formas de inventariar e manter a biodiversidade sendo uma importante ferramenta para a obtenção de informações, distribuição e conteúdo dessa 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, como a qualidade da identificação do acervo (d'Avila-Levy *et al.* 2016; <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=colecoes>).

Atualmente, com o advento da biologia molecular, algumas coleções científicas agregam dados genômicos aos seus depósitos biológicos. Esse

conjunto de dados é particularmente relevante às coleções de microorganismos, que por muitas vezes são de difícil cultivo e conservação (Suarez & Tsutsui 2004).

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, entre outros. Apenas em 2010, foi reconhecida institucionalmente sob o nome de Coleção de Protozoários da Fiocruz ([www.colprot.fiocruz.br](http://www.colprot.fiocruz.br)). Atualmente, seu acervo conta com mais de 400 espécimes de protozoários de diversas famílias, sendo a maioria representantes da classe Kinetoplastea, principalmente membros da família Trypanosomatidae (Figura 7). A coleção conta com diversos projetos que visam a ampliação do acervo através de coletas em diversos biomas, além da curadoria dos espécimes depositados ao longo dos anos. Essa curadoria é realizada principalmente pela identificação molecular dos espécimes.

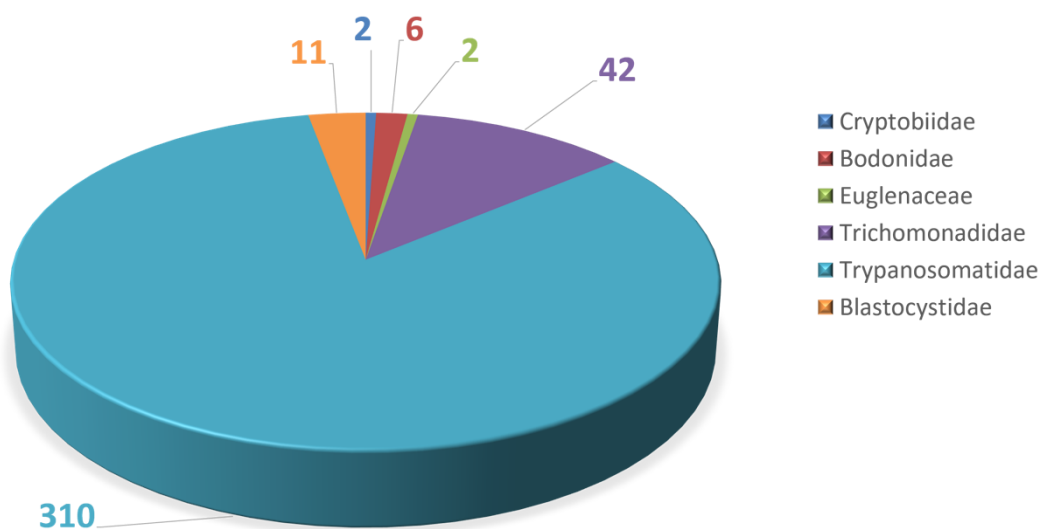


Fig. 7- Representação gráfica do atual acervo COLPROT.



## II. OBJETIVOS

### 1) Objetivo geral

- Realizar a curadoria das espécies de tripanossomatídeos isolados de insetos e plantas depositadas na Coleção de Protozoários da Fiocruz (Fiocruz-COLPROT) através da informação genômica de sequências parciais dos genes gGAPDH, das regiões V7/V8 do SSUrRNA e COI, que são comumente utilizados na identificação molecular de tripanossomatídeos (*DNA Barcoding*).

### 2) Objetivos específicos

- Resgatar e sistematizar o registro histórico das espécies analisadas.
- Sugerir um limiar mínimo para a porcentagem de divergência genética suficiente para separar as espécies e gêneros analisados através de sequências depositadas no Genbank dos principais marcadores utilizados na literatura: gGAPDH e SSUrRNA.
- Realizar a identificação taxonômica dos isolados depositados na COLPROT ainda não caracterizados, através de abordagem *DNA Barcoding*, assim como identificar novas espécies, corrigir possíveis erros de identificação e sugerir sinonimização das espécies geneticamente semelhantes.
- Avaliar a aplicabilidade do marcador COI na taxonomia de tripanossomatídeos.

### **III. METODOLOGIA**

#### **1) Origem das amostras**

##### **1.1. Tripanossomatídeos a serem estudados e método de cultivo**

Alguns dos critérios de escolha dos organismos que seriam sequenciados foram a disponibilidade, rastreabilidade e qualidade das informações do depósito. Do total de depósitos da família Tripanosomatidae (167 parasitos isolados de insetos e plantas) da COLPROT, nós realizamos a extração do DNA de 136 espécimes. A identificação inicial dos táxons foi feita de acordo com as informações disponíveis no registro da Coleção. Os seguintes gêneros de tripanossomatídeos foram estudados: *Blastocrithidia* (n = 3), *Crithidia* (n = 32), *Herpetomonas* (n = 15), *Leptomonas* (n = 12), *Strigomonas* (n = 4), *Angomonas* (n = 5), *Phytomonas* (n = 18), *Kentomonas* (n = 1) e *Sergeia* (n = 2), além de amostras isoladas de invertebrados ainda não identificadas (n = 44), que estão criopreservadas e depositadas na Coleção de Protozoários (COLPROT) da Fundação Oswaldo Cruz. As ampolas contendo os espécimes foram descongeladas e seu conteúdo cultivado em meio bifásico NNN/LIT (Nicolle-Novy-Neal/ Liver Infusion Tryptose; Nicolle, 1908) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As espécies foram mantidas a 26 °C através de repiques semanais em meio LIT. As identificações iniciais utilizadas foram aquelas fornecidas pelos próprios depositantes, catalogadas nos registros do acervo.

#### **2) Identificação molecular**

A identificação molecular das amostras foi realizada utilizando dois genes nucleares (gGAPDH e V7V8 SSUrRNA), que amplificam 800-pb cada (Borghesan *et al.*, 2013) e um mitocondrial (COI) desenvolvido pelo nosso grupo e colaboradores, que amplifica aproximadamente 600 pb.

#### **Etapas da caracterização molecular:**

##### **a) Extração e quantificação de DNA**

No meio da fase log de cultivo,  $1 \times 10^7$  células foram obtidas por centrifugação (1500  $\times$  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<sup>®</sup> Genomic (Promega, Wisconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

## b) Reação em cadeia da polimerase

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e foram submetidas a testes e ajustes quanto à temperatura, concentração de magnésio e condições de ciclagem para amplificação da região de cada um dos marcadores moleculares utilizados para cada espécie analisada. As concentrações de reagentes utilizadas para cada marcador estão descritas nas Tabelas 2, 3 e 4. Os ciclos de amplificação além das sequências de cada iniciador estão descritos na Tabela 5:

Tabela 2: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo gGAPDH

Reagentes	Concentração inicial	Volume inicial
Tampão	1×	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	0,75 µL
dNTP	200 µM	2 µL
gGAPDH F	0,4 µM	1 µL
gGAPDH R	0,4 µM	1 µL
Taq platinum	1,5 U	0,3 µL
Água estéril para PCR	-	15,45 µL
DNA	15 ng/µL	2 µL
<b>TOTAL</b>		<b>25 µL</b>

Tabela 3: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo SSUrRNA

Reagentes	Concentração inicial	Volume inicial
Tampão	1×	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	1,25 µL
dNTP	250 µM	2,5 µL
SSUrRNA F	0,2 µM	0,5 µL
SSUrRNA R	0,2 µM	0,5 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL
Água estéril para PCR	-	15,5 µL
DNA	15 ng/µL	2 µL
<b>TOTAL</b>		<b>25 µL</b>

Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados para amplificação do alvo COI

Reagentes	Concentração inicial	Volume inicial
Tampão	1×	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	1,25 µL
dNTP	250 µM	2,5 µL
COI F	0,25 µM	0,63 µL
COI R	0,25 µM	0,63 µL
Taq platinum	1 U	0,2 µL
Água estéril para PCR	-	15,29 µL
DNA	15 ng/µL	2 µL
<b>TOTAL</b>		<b>25 µL</b>

Tabela 5: Descrição dos iniciadores

Gene e Oligonucleotídeos	Condições iniciais para amplificação
<b>COI – 626 pb (manuscrito em preparação)</b>	<b>Desnaturação:</b> 95 °C- 3 min (1 vez)
COI F (5'CCWACWACAAACATRTGRTGCGYGC 3')	<b>Desnaturação, anelamento e extensão:</b> 95 °C- 1 min; 52-60 °C- 30 seg; 72°C- 1 min (35 ciclos)
COI R (5' TCCHGATATGGTWTTKCCYCG 3')	<b>Extensão final:</b> 72 °C- 10 min (1 vez)
<b>gGAPDH – 800 pb (Borghesan <i>et al.</i> 2013)</b>	<b>Desnaturação:</b> 94 °C- 3 min (1 vez)
gGAPDH F (5'GGBCGCATGGTSTTCCAG3')	<b>Desnaturação, anelamento e extensão:</b> 94 °C- 1 min; 52-60 °C- 2 min; 72°C- 2 min (30 ciclos)
gGAPDH R (5'CCCCACTCGTTRTCRTACC3')	<b>Extensão final:</b> 72 °C- 10 min (1 vez)
<b>V7V7 SSU rRNA- 800 pb (Borghesan <i>et al.</i> 2013)</b>	<b>Desnaturação:</b> 94 °C- 5 min (1 vez)
V7V8 SSU rRNA F (5'CACCCGCGGTAATTCCAGC3')	<b>Desnaturação, anelamento e extensão:</b> 94 °C- 30 seg; 52-60 °C- 2 min; 72°C- 2 min (35 ciclos)
V7V8 SSU rRNA R (5'CTGAGACTGTAACCTCAA3')	<b>Extensão final:</b> 72 °C- 10 min (1 vez)

### c) Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram adicionados de tampão de amostra DNA Gel Loading Dye [Tris-HCl 10 mM pH 7,6; azul de bromofenol 0,03%; xilenocianol 0,03%; glicerol 60%; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 60 mM] (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e o intercalante de DNA GelRed™ (Biotium) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris 1,1 M; Ácido Bórico 0,9 M; EDTA 25 mM,

pH 8.3) por 50 min a 90 V. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados e fotodocumentados em equipamento UVP *Bioimaging Systems* (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel).

#### **d) Purificação do produto de PCR**

A purificação da solução dos produtos da reação de PCR foi realizada através de kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, EUA), utilizando o protocolo do fabricante.

#### **e) Sequenciamento**

O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento RPT01A- PDTIS/Fiocruz (ABI 3730XL Applied Biosystem) através do método de Sanger (Sanger *et al.* 1975). A reação de sequenciamento foi realizada com uso do kit de extração *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), utilizando a reação adaptada com 2 µL de DNA molde (5-20 ng), 1,88 µL de Tampão 5× (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 0,25 µL de BigDye e água Milli-Q qsp 5,37 µL. A ciclagem da reação consiste em 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. As amostras foram processadas na plataforma de sequenciamento e submetidas ao processo de precipitação e desnaturação da reação de sequenciamento.

#### **f) Análise das sequências**

Os cromatogramas gerados no sequenciamento foram avaliados quanto à qualidade, editados e alinhados no programa DNASTar (SeqMan) (Lasergene, 1994). A edição das sequências consistiu em identificar regiões de alta qualidade e informativas (picos livres de ruídos), e remover as regiões de flaqueamento dos iniciadores. As sequências obtidas para os alvos COI e gGAPDH editadas das espécies do acervo da COLPROT foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999) através da ferramenta *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). As sequências geradas para SSUrRNA foram alinhadas no MAFFT (Kato *et al.*, 2013) utilizando os parâmetros pré-estabelecidos no software. As sequências dos alvos gGAPDH e SSUrRNA foram comparadas com sequências de tripanossomatídeos disponíveis Genbank (Tabela 6) através do algoritmo *Blastn* usando o servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), que realiza a busca por similaridade das sequências, para curadoria. Essas sequências também foram utilizadas no alinhamento desses alvos. Em seguida foram submetidas a análises filogenéticas. Como não há sequências disponíveis em banco de dados para o alvo COI, essa comparação não foi possível.

Tabela 6: Sequências do Genbank utilizadas para comparação taxonômica.

Organismos	Nomenclatura atualizada	Número de acesso no Genbank	
		SSU rRNA	gGAPDH
<i>Crithidia</i>			
<i>Crithidia fasciculata</i>		-	AF047493
<i>Crithidia deanei</i>	<i>Angomonas deanei</i>	-	EF546792
<i>Crithidia otongatchiensis</i>		KC205989	KF482058
<i>Crithidia brachyflagelli</i>		JF717840	JF717835
<i>Crithidia confusa</i>		JF717837	JF717832
<i>Crithidia insperata</i>		EU079125	EU076605
<i>Crithidia expoeki</i>		KM980187	GU321193
<i>Crithidia bombi</i>		KM980185	GU321192
<i>Crithidia permixta</i>		EU079127	EU076607
<i>Crithidia abscondita</i>		EU079126	EU076606
<i>Crithidia brevicula</i>		KJ443353	KJ443343
<i>Crithidia luciliae</i>			AF053740
<i>Crithidia praguensis</i>		KC205988	KF482060
<i>Crithidia mellificae</i>		-	KJ713339
<i>Leptomonas</i>			
<i>Leptomonas tenua</i>		KF054114	KF054086
<i>Leptomonas barvae</i>		FJ968532	FJ968529
<i>Leptomonas spiculata</i>		JF717838	JF717833
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>		JN036653	JN036651
<i>Leptomonas podlipaevi</i>		DQ383649	DQ019001
<i>Leptomonas jaderae</i>		EU079123	EU076603
<i>Leptomonas lactosovorans</i>	<i>Herpetomonas samueli</i>	-	EU076602
<i>Leptomonas tarcoles</i>		EF546786	EF546787
<i>Leptomonas seymouri</i>		AF153040	KP717896
<i>Leptomonas costaricensis</i>		DQ383648	DQ383650
<i>Leptomonas acus</i>		DQ910923	DQ910926
<i>Leptomonas bifurcata</i>		DQ910925	DQ910928

<i>Leptomonas moramango</i>	KC205990	KF482059
<i>Angomonas</i>		
<i>Angomonas deanei</i>	HM593011	HM593022
	-	HM593023
	-	HM593024
	-	EU079131
	-	EU079130
<i>Angomonas desouzai</i>	HM593017	HM593020
	-	HM593021
<i>Angomonas ambiguus</i>	HM593015	HM593019
<i>Strigomonas</i>		
<i>Strigomonas culicis</i>	HM593009	EU079137
<i>Strigomonas galati</i>	HM593010	HM593018
<i>Strigomonas oncopelti</i>	AF038025	EU079135
<i>Herpetomonas</i>		
<i>Herpetomonas muscarum</i>	JQ359731	DQ092548
<i>Herpetomonas mirabilis</i>	JQ359729	JQ359739
<i>Herpetomonas modestus</i>	JQ359726	JQ359736
<i>Herpetomonas costoris</i>	JQ359728	JQ359738
<i>Herpetomonas samueli</i>	-	JQ359742
<i>Herpetomonas tarakana</i>	KR868691	KR868692
<i>Herpetomonas samuelpeessoai</i>	JQ359716	JQ359747
<i>Herpetomonas isaaci</i>	JQ359720	JQ359745
<i>Herpetomonas puellarum</i>	JQ359723	JQ359734
<i>Herpetomonas elegans</i>	JQ359725	JQ359735
<i>Herpetomonas trimorpha</i>	EU179326	FJ850241
<i>Herpetomonas ztiplika</i>	AF416560	FJ850242
<i>Herpetomonas roitmani</i>	AF038023	EU079130
<i>Lafontella</i>		
<i>Lafontella mariadeanei</i>	JQ359714	JQ359741
<i>Phytomonas</i>		
<i>Phytomonas serpens</i>	AF016320	HQ685123
<i>Phytomonas</i> sp.	-	EU084895
<i>Phytomonas nordicus</i>	KT223609	-

---

<i>Wallacemonas</i>		
<i>Wallacemonas collosoma</i>	AF153038	EU084898
	JN582046	EU084899
<i>Wallaemonas raviniae</i>	KC205996	KF482057
<i>Kentomonas</i>		
<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	KM242075	KM242072
<i>Lotmaria</i>		
<i>Lotmaria passim</i>	KM066239	KJ713352
<i>Sergeia</i>		
<i>Sergeia podlipaev</i>	DQ394362	DQ394365
<i>Jaenimonas</i>		
<i>Jaenimonas drosophilae</i>	KP260534	KP260535
<i>Blechomonas</i>		
<i>Blechomonas keeling</i>	KF054132	KF054110
<i>Blechomonas maslovi</i>	KF054125	KF054106
<i>Blechomonas englundi</i>	KF054120	KF054108
<i>Blechomonas luni</i>	KF054115	KF054103
<i>Novymonas</i>		
<i>Novymonas esmeraldas</i>	KT944309	KT944300
<i>Bodo</i>		
<i>Bodo saltans</i>	AF208889	DQ915847

---

### **g) Análises filogenéticas**

O alinhamento das sequências nucleotídicas geradas para cada marcador molecular juntamente com todas as sequências de tripanossomatídeos isolados de insetos e plantas no Genbank (Tabela 6) foi feito no programa BioEdit (Hall, 1999). Os resultados dos alinhamentos foram realizados utilizando o *software* MEGA versão 7 (Tamura *et al.*, 2011) e uma árvore de distância foi construída utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980). Este modelo leva em consideração dois tipos de substituições (transição e transversão) e foi o modelo adotado para análises do tipo *Barcode*. A partir desta informação, foi gerada uma árvore baseada no método de distância de *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987). A consistência da topologia da árvore é testada através de 1000 replicações de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), assumindo



a partir de 70% como um valor confiável. Para a construção da árvore filogenética foi empregado o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) utilizando o programa Mega versão 7. A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica foi feito utilizando o programa *jModelTest* versão 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo mais adequado para as sequências dos três marcadores utilizados de acordo com o critério de informação Akaike (AIC) foi GTR+I+G (sítios invariáveis (I) + 4 parâmetros de distribuição gamma (G)).

#### **h) Análise da divergência genética**

A fim de estipular um valor limítrofe da porcentagem de divergência genética que atenda tanto as mudanças de classificação taxonômica quanto as sinonímias entre espécies de tripanossomatídeos, sobre tudo para os representantes de insetos e plantas, foram analisadas as sequências dos marcadores mais utilizados na literatura para este grupo de organismos. Após a realização de uma extensa pesquisa bibliográfica, os gêneros e espécies eleitos para análise foram *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Bleptomonas*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e *Crithidia* (Tabela 6). As espécies foram escolhidas principalmente por apresentarem uma taxonomia já descrita e bem definida segundo os autores. Os genes analisados foram o gGAPDH e SSU por apresentarem numerosas sequências disponíveis em banco de dados. As sequências foram adquiridas a partir do Genbank. Comparação par-a-par foram realizadas com a finalidade de observar os valores mínimos utilizados pelos autores na descrição de novas espécies e gêneros e na sugestão de sinonímias. As análises de distância genética realizadas foram as mesmas utilizadas para as amostras da COLPROT descritas no item “**f Análise das sequências**”.

#### **i) Pesquisa histórica dos depósitos da Coleção de Protozoários**

Para cada depósito da COLPROT utilizado neste trabalho, um resgate histórico foi realizado através de consulta ao livro tomo da Coleção, pesquisas em artigos científicos publicados, resumos de congressos e, quando possível, entrevista/ conversa com os depositantes. Os dados provenientes da pesquisa alimentaram o banco de dados interno Sicol (<http://sicol.fiocruz.br/>), tornando toda a informação a respeito dos depósitos da coleção disponível publicamente no site da COLPROT ([www.colprot.fiocruz.br](http://www.colprot.fiocruz.br)).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

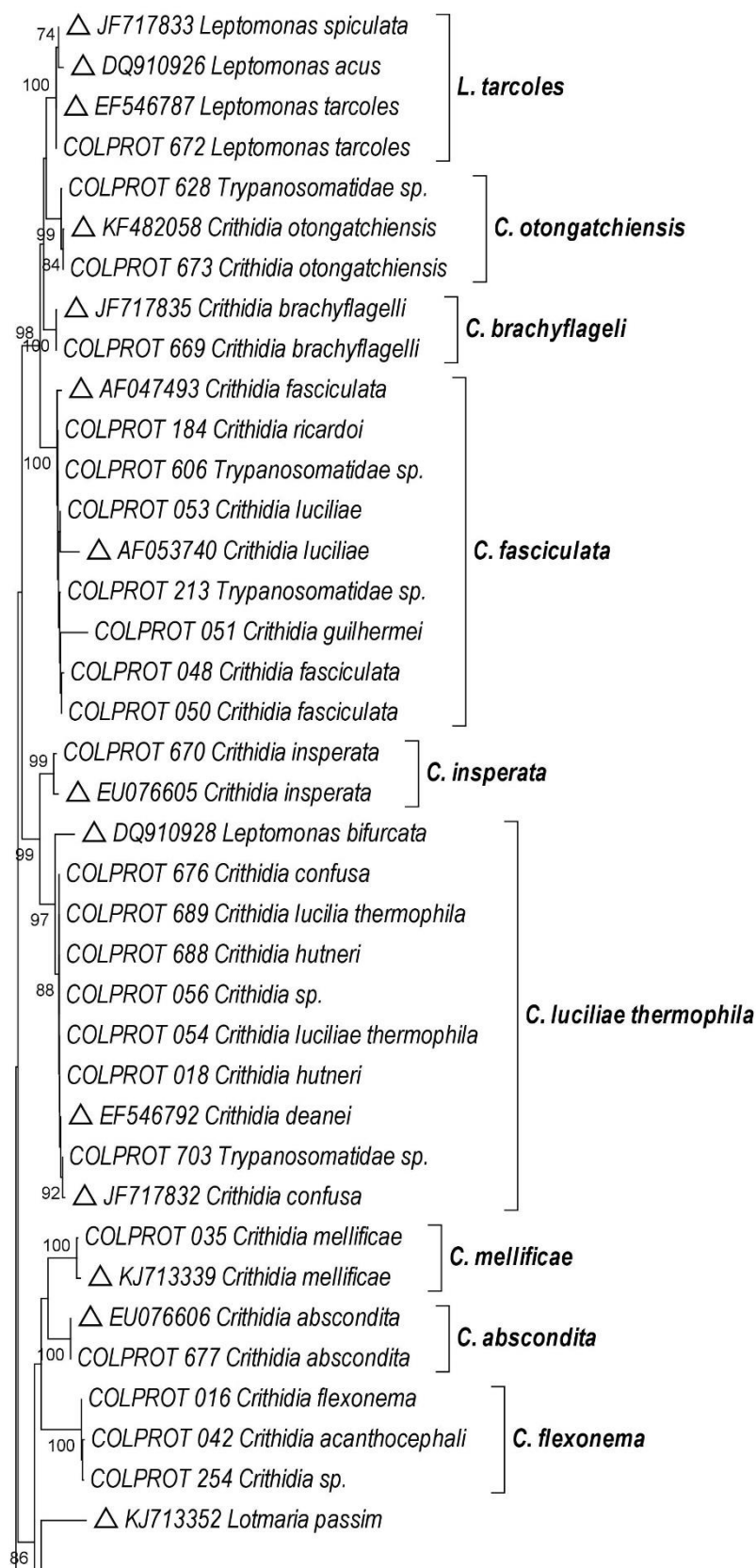
### 1. Taxonomia molecular

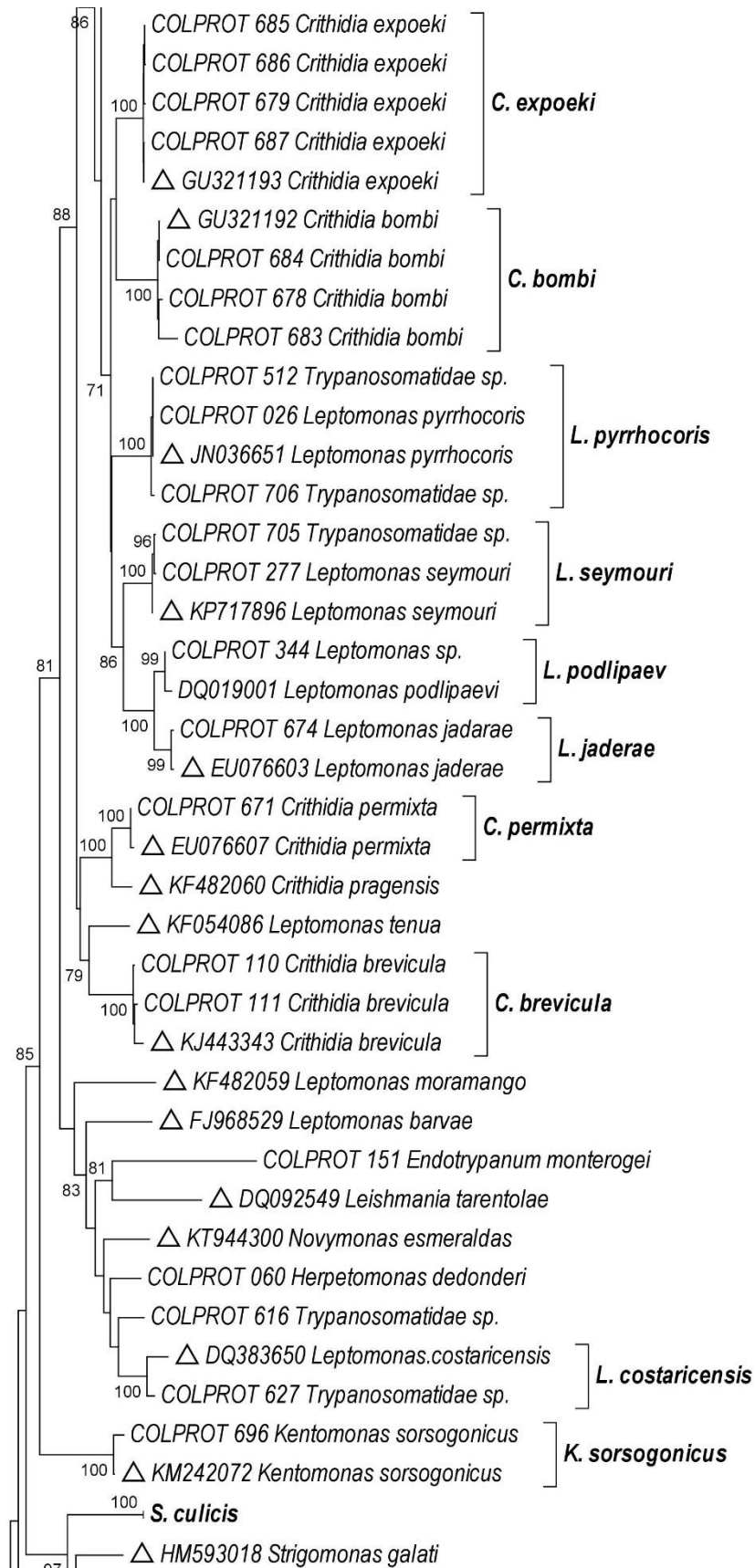
Marcadores moleculares vêm sendo cada vez mais utilizados como ferramenta auxiliar na taxonomia de tripanossomatídeos devido a enorme diversidade do grupo e ausência de marcadores fenotípicos capazes por si só de diferenciar espécies. Porém, analisar um único marcador molecular não é suficiente para inferir a filogenia e realizar a classificação taxonômica desses organismos, uma vez que esta abordagem nos permite conhecer a história evolutiva apenas do gene analisado, e não das espécies em questão. A abordagem multilocus prevê um consenso dos marcadores utilizados a respeito da história evolutiva das espécies analisadas, buscando reduzir os efeitos da evolução gênica individual. Uma taxonomia integrativa polifásica (que une as ferramentas da taxonomia molecular com os conhecimentos da taxonômica clássica morfológica) é o almejado para maior acurácia na descrição e re-descrição de espécies (Votýpka *et al.* 2015). Análises morfológicas, comportamento em cultivo, características bioquímicas, desenvolvimento no hospedeiro e demais informações, como presença de simbionte, devem sempre ser consideradas e não um limiar absoluto baseado unicamente em padrão de divergência genética.

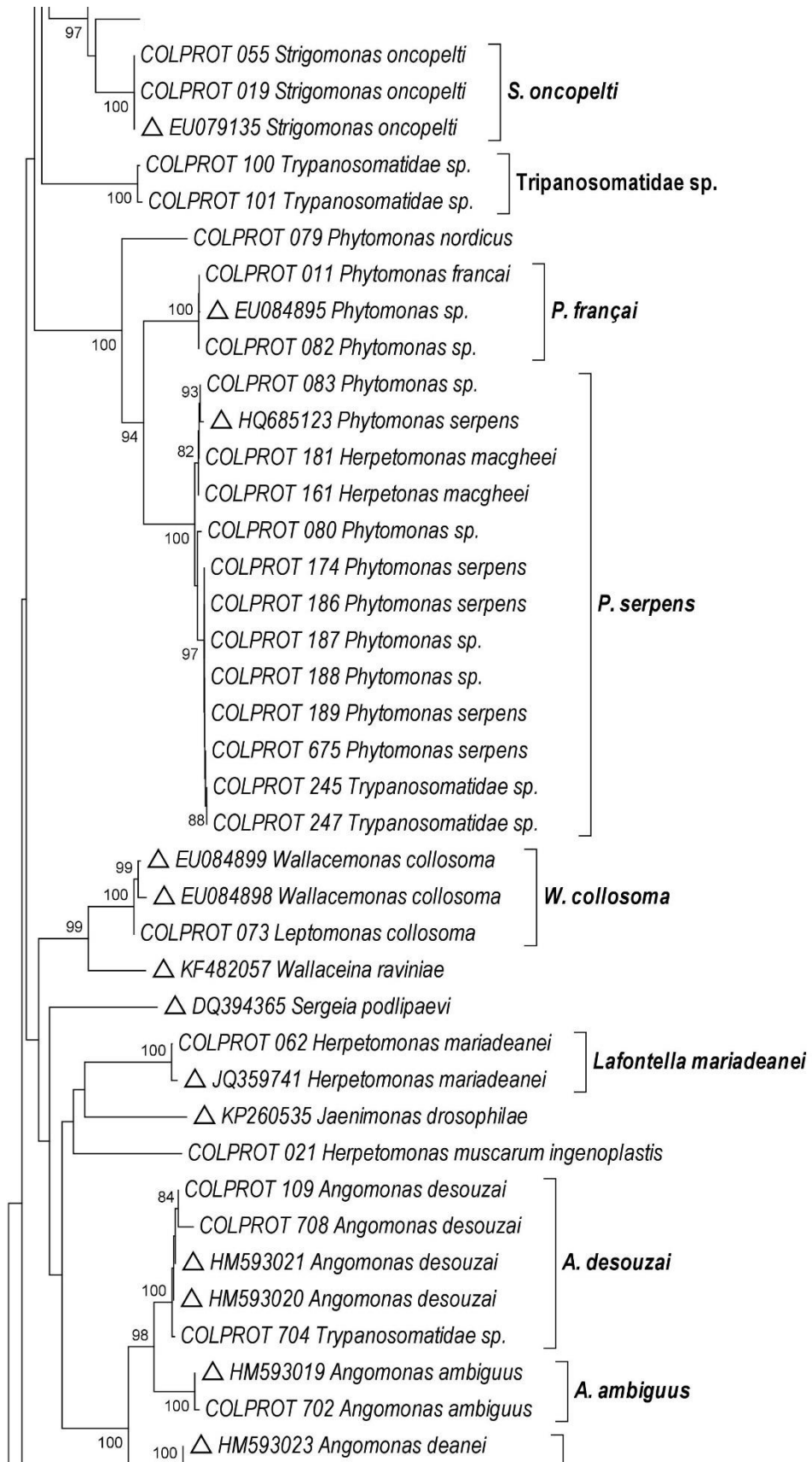
#### 1.1. Marcadores moleculares utilizados na literatura

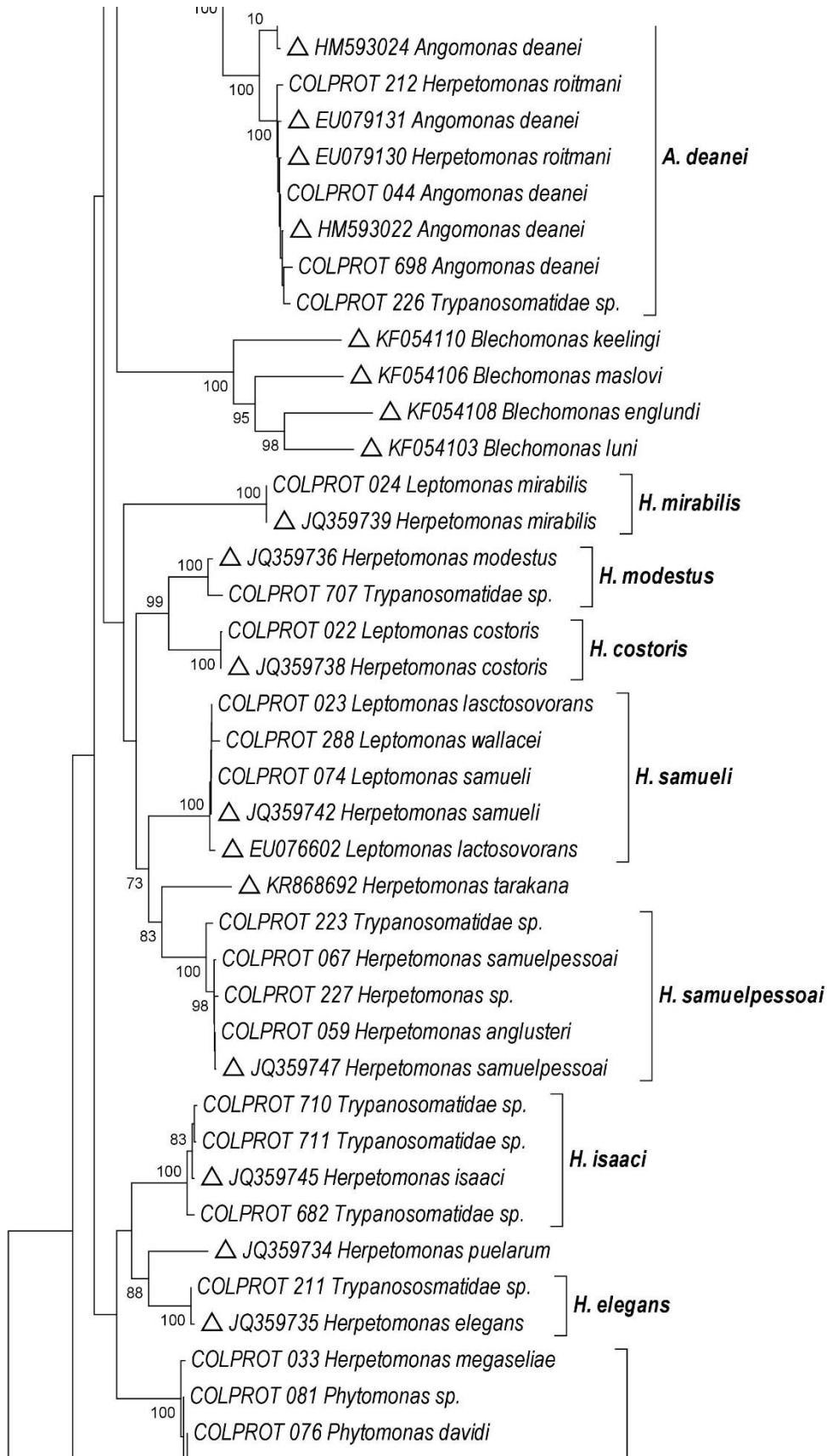
Análises das sequências dos genes SSU rRNA e gGAPDH são comumente utilizadas no estudo filogenético dos tripanossomatídeos, e são propostas como *barcode* de tripanossomatídeos (Hamilton *et al.*, 2004, 2005a, 2005b; Viola *et al.*, 2009; Maslov *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011; Votýpka *et al.*, 2015). Em nossas análises utilizamos iniciadores que amplificaram um produto de aproximadamente 800 pb das regiões variáveis (V7V8) da subunidade menor do gene ribossomal, e um fragmento de aproximadamente 800 pb do gene gGAPDH. O resultado gerado para ambos os marcadores se mostrou congruente (Figuras 8, 9, 10 e 11). No entanto, o gene gGAPDH se mostrou mais resolutivo em comparação ao gene ribossômico. Isso porque o gene ribossômico não foi capaz de separar espécies que são evolutivamente mais próximas (Anexo I, maiores detalhes na seção 3). Isso se deve ao fato de a subunidade menor do gene ribossomal apresentar uma taxa de evolução menor do que o restante do gene (Hillis & Dixon, 1991).

Figura 8- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH









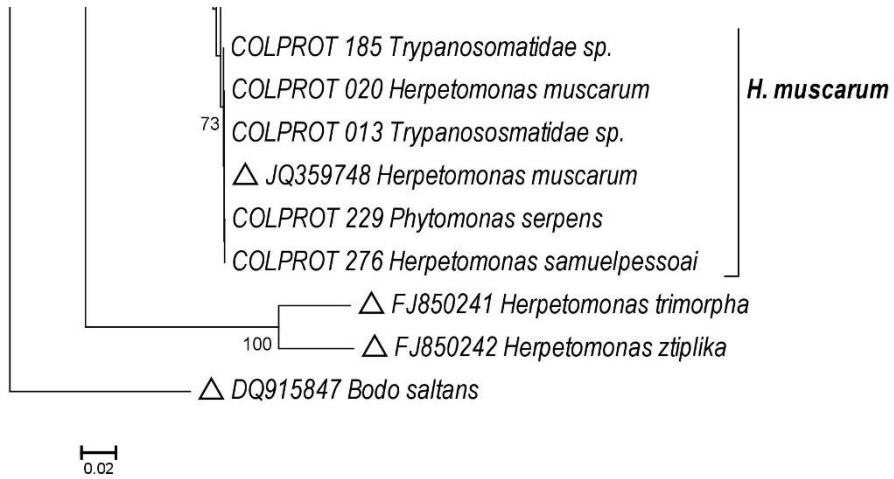


Figura 8- Árvore de distância genética construída no software MEGA v7.0 para sequências de 800-pb do gGAPDH pelo método de *neighbor-joining* com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros. A confiabilidade dos clados foi testada com 1000 replicatas de *bootstrap* (valores acima dos nós em cada bifurcação). Valores menores que 70% não foram mostrados. Os colchetes a direita indicam a espécie de cada unidade de tipagem.

Figura 9- Análise de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para o gene gGAPDH

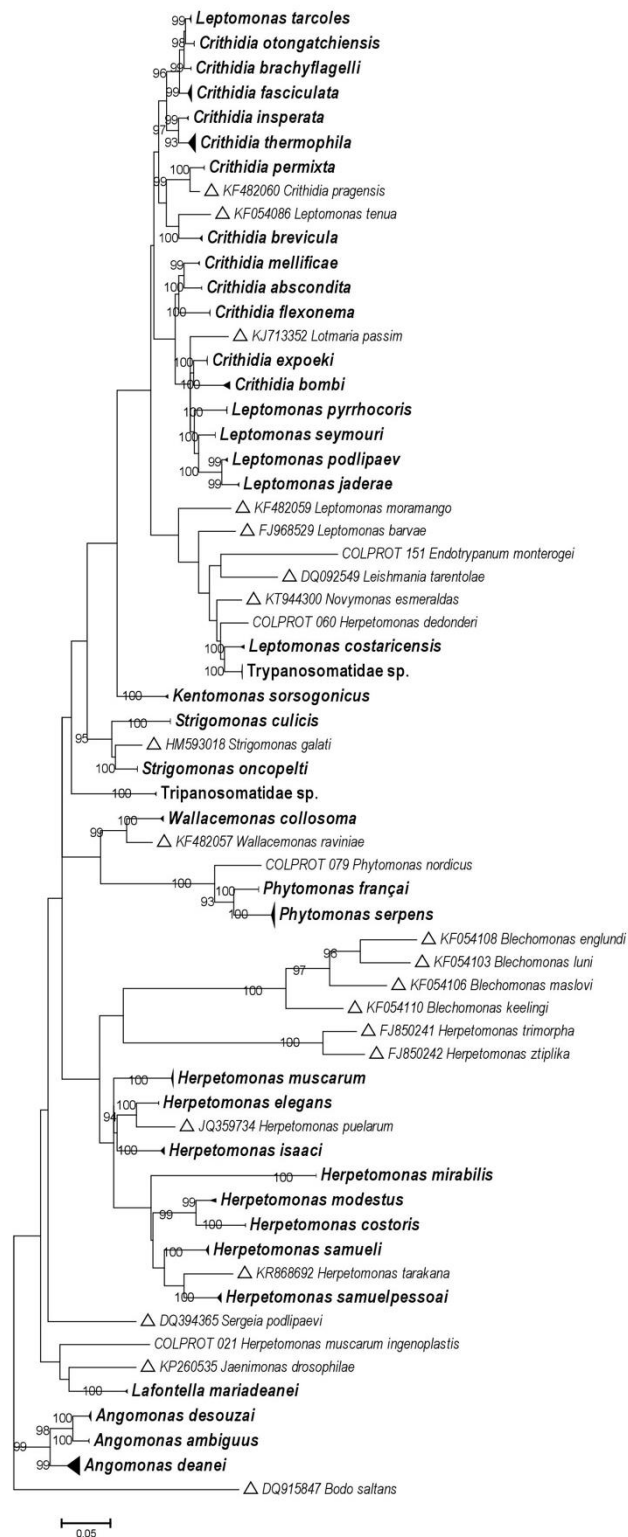
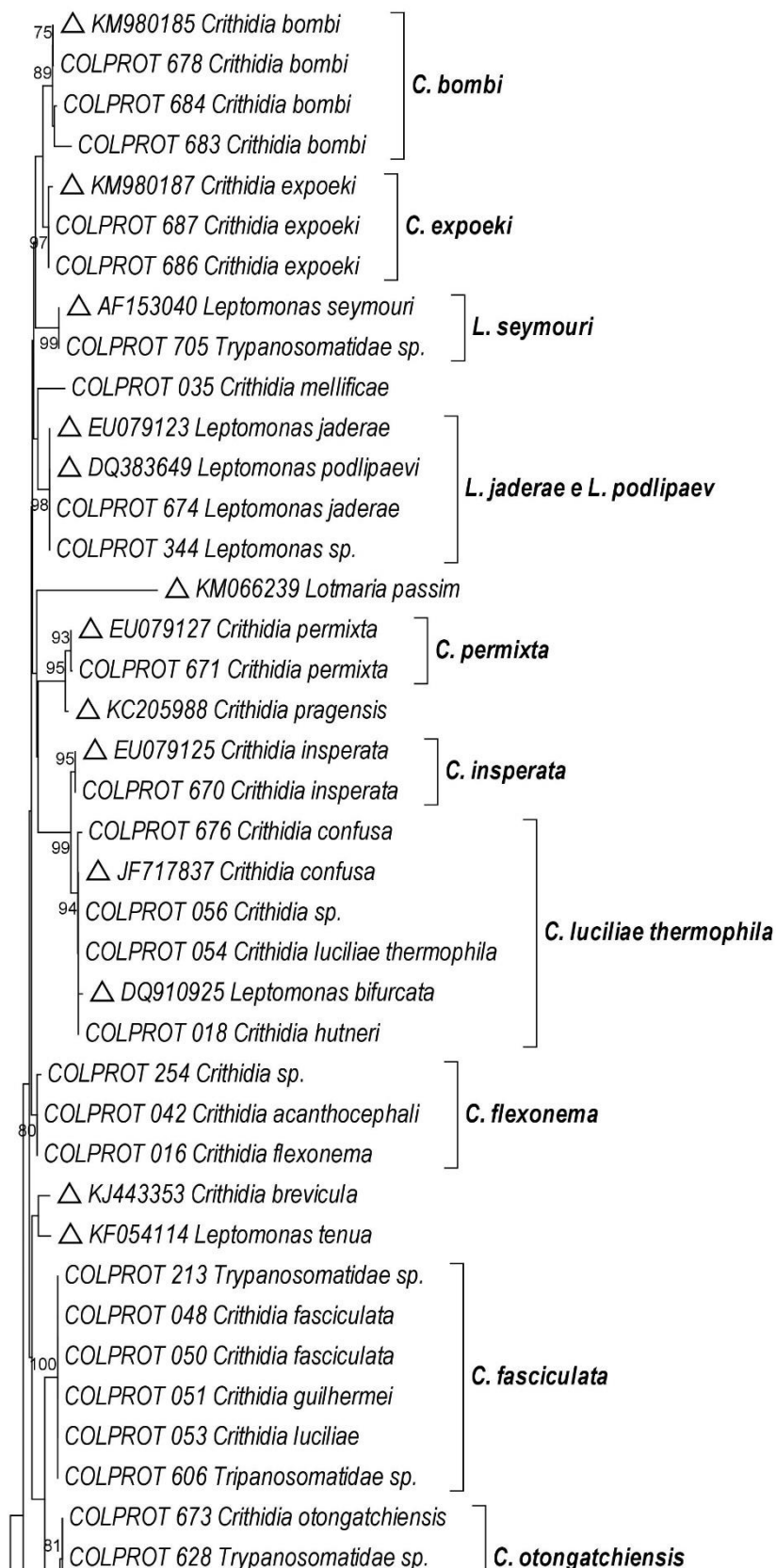
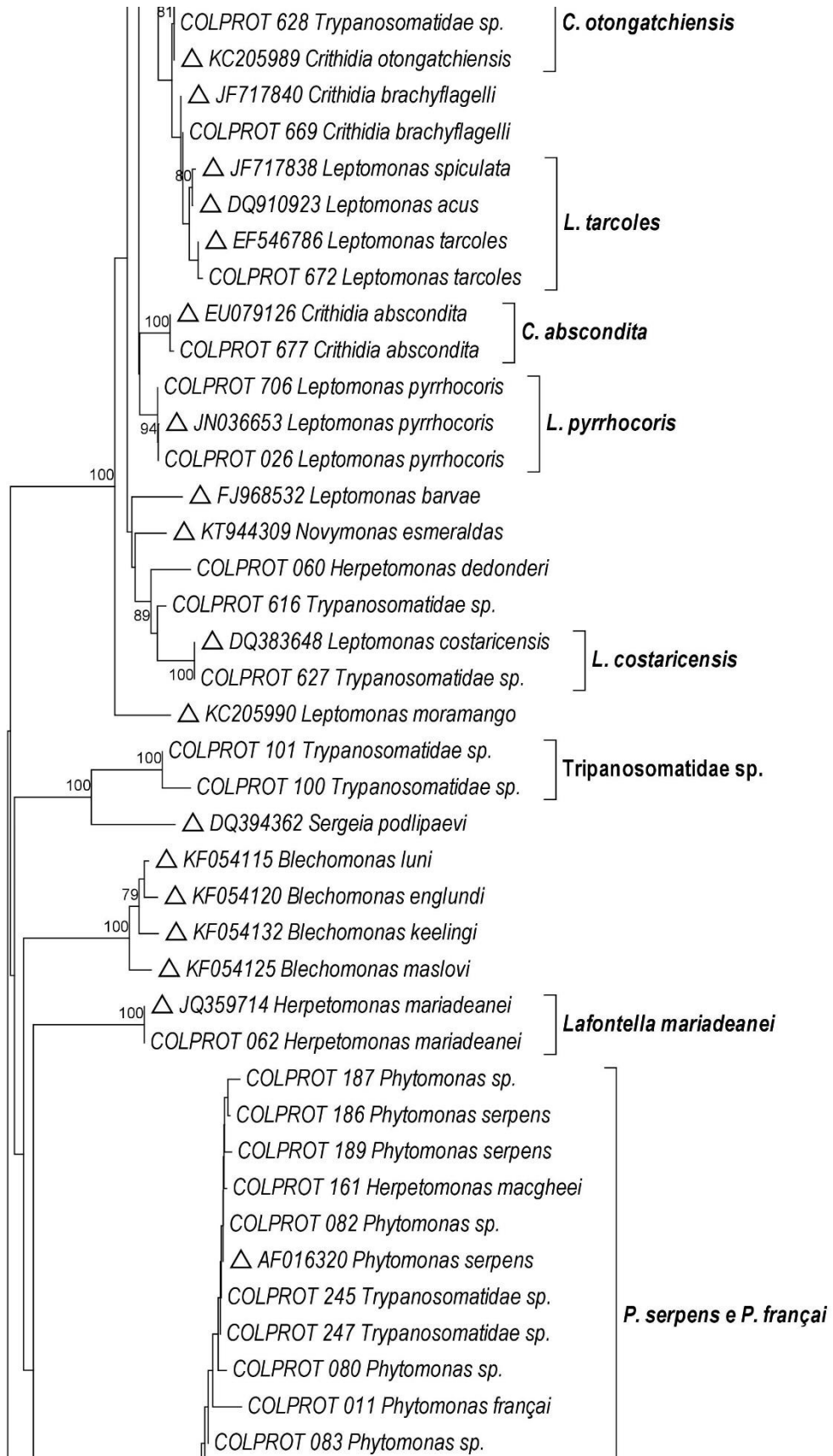


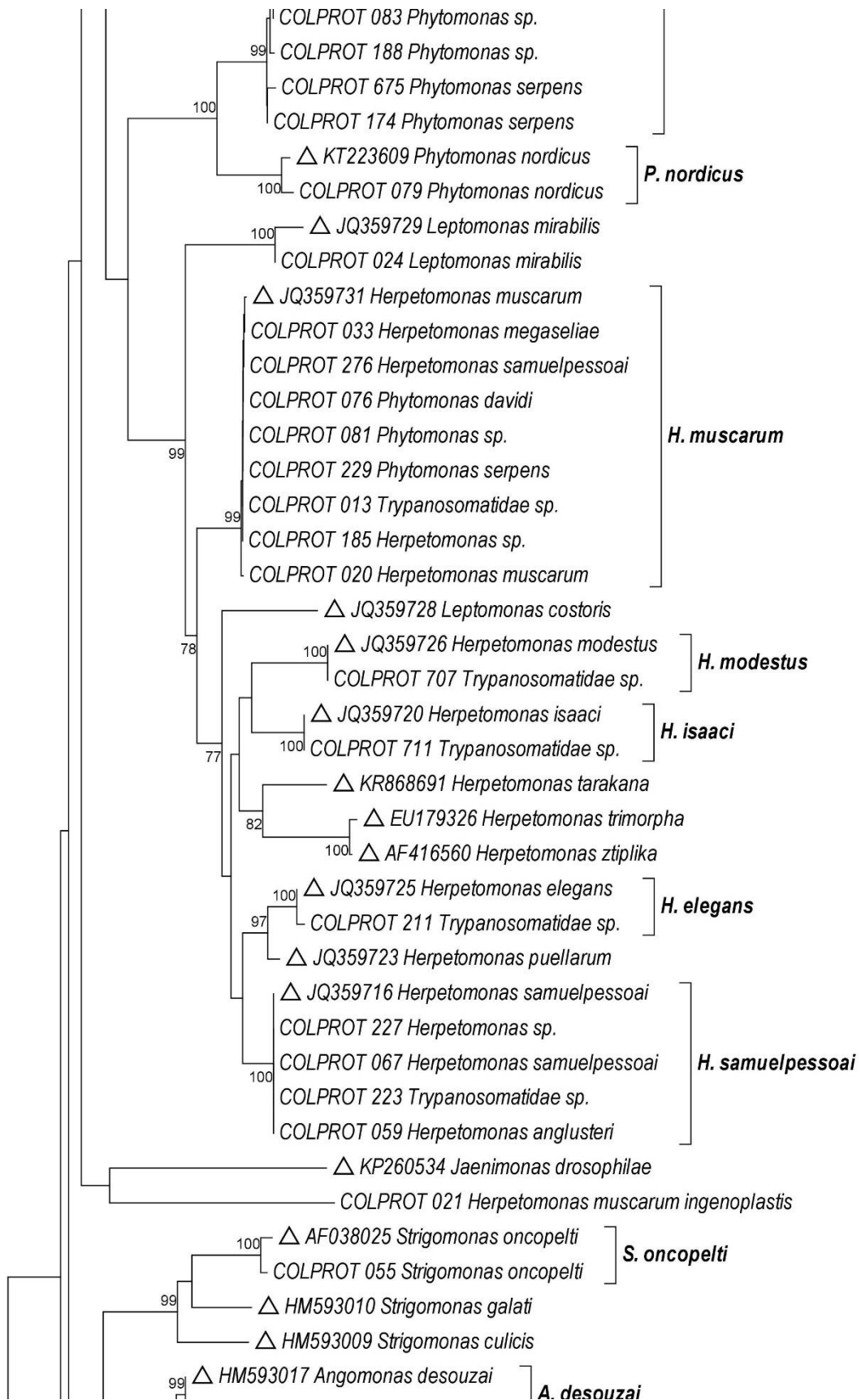
Figura 9- Árvore filogenética empregada com o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para o gene gGAPDH (~800 pb) utilizando o programa Mega v7. A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica foi feito utilizando o programa *jModelTest* versão 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo mais adequado para as sequências dos três marcadores utilizados de acordo com o critério de informação Akaike (AIC) foi GTR+I+G.



Figura 10- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSUrRNA







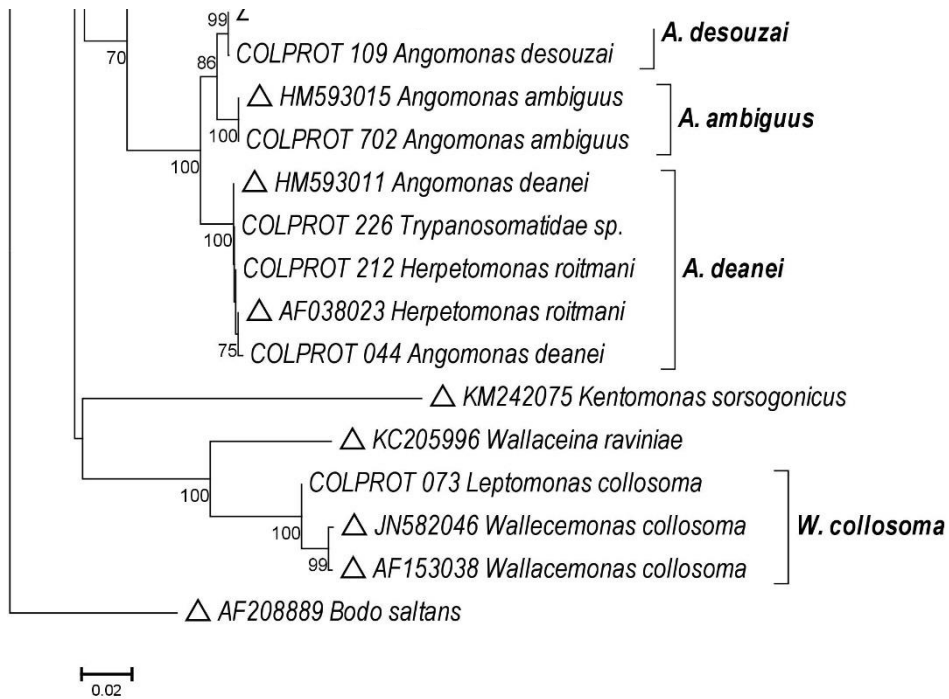


Figura 10- Árvore de distância genética construída no software MEGA v7.0 para sequências de 800-pb da região V7V8 do gene SSUrRNA pelo método de *neighbor-joining* com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros. A confiabilidade dos clados foi testada com 1000 replicatas de *bootstrap* (valores acima dos nós em cada bifurcação). Valores menores que 70% não foram mostrados. Os colchetes a direita indicam a espécie de cada unidade de tipagem.

Figura 11- Análise de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para o gene SSUrRNA

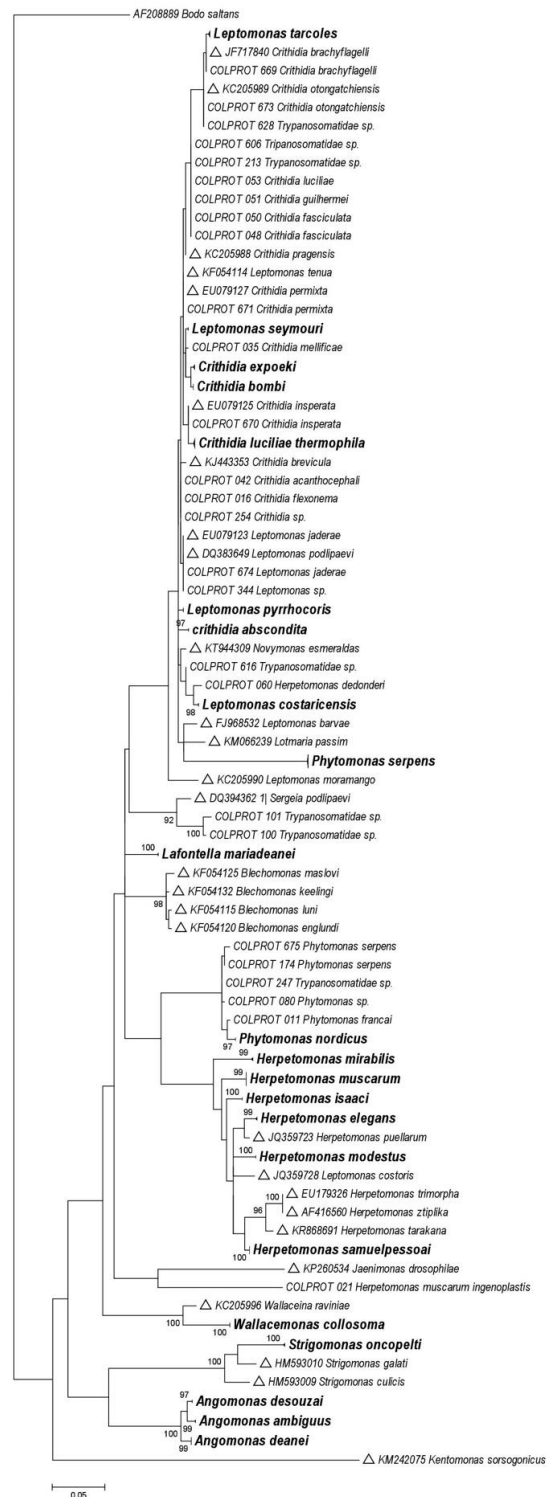


Figura 11- Árvore filogenética empregada com o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para para a região V7V8 do gene SSUrRNA (~800 pb) utilizando o programa Mega v7. A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica foi feito utilizando o programa *jModelTest* versão 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo mais adequado para as sequências dos três marcadores utilizados de acordo com o critério de informação Akaike (AIC) foi GTR+I+G.

## **1.2. Marcador mitocondrial**

O genoma mitocondrial, por evoluir mais rapidamente que regiões codificantes do genoma nuclear, torna-se bastante útil na investigação das relações entre organismos que divergiram recentemente, enquanto regiões mais conservadas são mais apropriadas para a comparação entre táxons mais divergentes. Embora o código de barras de DNA seja amplamente utilizado para a identificação de diversas espécies de metazoários, o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I, que foi o primeiro gene proposto para esta abordagem, tem sido pouco utilizado para protozoários em geral. Diante desse cenário, tivemos a iniciativa de avaliar a capacidade do COI em discriminar espécies de tripanossomatídeos, desenhando um par de iniciadores que amplifica aproximadamente 600 pb do gene e sequenciando o fragmento pelo método de Sanger. Nossas análises mostram que o marcador é bastante promissor, por apresentar resultados congruentes com os outros dois marcadores amplamente utilizados em protozoários (gGAPDH e SSUrRNA), sendo capaz de separar com robustez espécies e grupos filogeneticamente próximos (Figuras 12 e 13).

Figura 12- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI

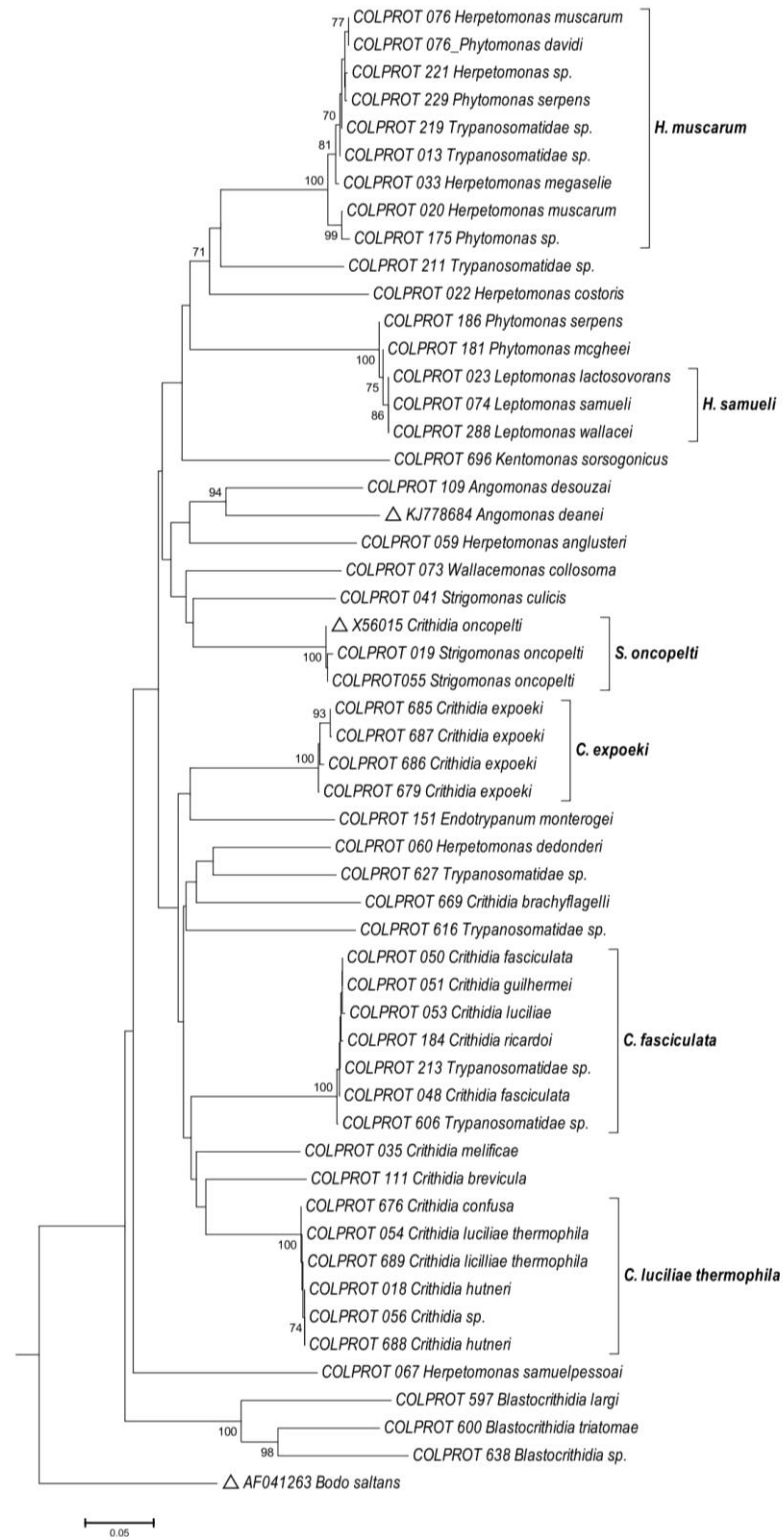


Figura 12- Árvore de distância genética construída no software MEGA v7.0 para sequências de 600-pb do gene COI pelo método de *neighbor-joining* com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros. A confiabilidade dos clados foi testada com 1000 replicatas de *bootstrap* (valores acima dos nós em cada bifurcação). Valores menores que 70% não foram mostrados. Os colchetes a direita indicam a espécie de cada unidade de tipagem.

Figura 13- Análise de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para o gene COI

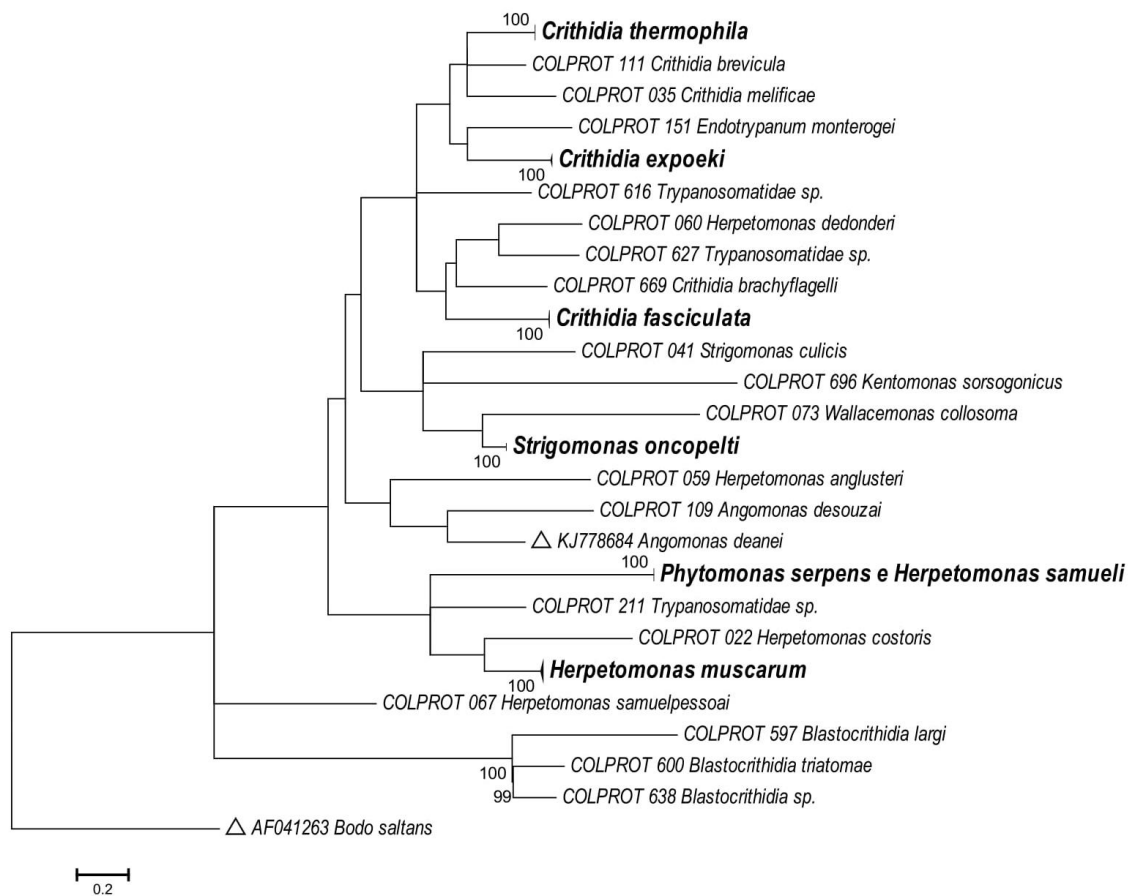


Figura 13- Árvore filogenética empregada com o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) do gene COI (~600 pb) utilizando o programa Mega v7. A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica foi feito utilizando o programa *jModelTest* versão 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo mais adequado para as sequências dos três marcadores utilizados de acordo com o critério de informação Akaike (AIC) foi GTR+I+G.



## 2. Determinação do padrão de divergência genética em tripanossomatídeos.

Para nortear os resultados e melhor compreender os padrões de divergência genética entre as espécies de tripanossomatídeos, nós fizemos um levantamento bibliográfico e de sequências e posterior análise de bioinformática, buscando observar um padrão de divergência genética para definir um limiar entre espécies e gêneros distintos utilizado pelos principais pesquisadores da área para os dois marcadores moleculares mais frequentes. Essa análise foi realizada principalmente porque na literatura não há um consenso quanto a este fato.

O conceito de espécie biológica ainda hoje é uma questão bastante controversa para todos os organismos conhecidos. Definir um gênero ou uma espécie entre microorganismos é ainda mais difícil. Em tripanossomatídeos, este conceito também permanece evasivo e a classificação da família Trypanosomatidae é confusa, principalmente entre os parasitos de insetos, uma vez que são menos estudados que os parasitos de vertebrados. 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 esta razão, nós realizamos análises de divergência genética para os alvos gGAPDH e SSUrRNA com o alinhamento das sequências disponíveis em banco de dados (Tabela 6). A partir das nossas análises foi possível uma matriz de distância utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros, mesma metodologia empregada pelo DNA *barcoding*. As espécies que foram selecionadas para esta análise fazem parte de (re) descrições recentes de gêneros e espécies novas e foram escolhidas para representar padrões de divergência entre espécies do gênero *Angomonas* (Anexo II), *Herpetomonas* (Anexo III), *Phytomonas* (Anexo IV), além de espécies selecionadas de oito gêneros diferentes (Anexo V).

O resultado observado sugere que, para o conjunto de espécies analisadas, o marcador gGAPDH discrimina melhor espécies próximas quando utilizamos a abordagem de código de barras, quando comparado às regiões V7/V8 do SSUrRNA. O gGAPDH parece ter maior resolução para espécies próximas, com o qual observamos um limiar de pelo menos 4% de divergência genética para distinguir espécies válidas. Vale ressaltar que para inferir novos gêneros, são necessários mais padrões de comparação, como a utilização de genes mais conservados e a utilização de técnicas de microscopias ópticas e eletrônicas. O gene ribossômico apresenta regiões conservadas e regiões mais variáveis. As

regiões conservadas podem não apresentar diferenças para separar espécies próximas, por sofrerem pressão seletiva. No entanto, as regiões mais variáveis são mais utilizadas no estudo filogenético de espécies mais relacionadas. Nossos resultados diferem dos resultados esperados para este alvo. A região V7V8, utilizada como código de barras, não apresentou um alto poder resolutivo na análise de espécies próximas. O limiar observado para a separação de espécies válidas neste gene foi de apenas ~2% de divergência genética entre as espécies.

Os valores de divergência mostrados a seguir seguem um mesmo padrão no estudo da taxonomia de tripanossomatídeos. No trabalho de Teixeira e colaboradores (2011) no qual os autores sugerem a criação de dois novos gêneros de tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes, nós observamos uma variação de 1% para espécies mais próximas de *Angomonas* (*Angomonas ambiguus* e *Angomonas desouzai*) e até 3% entre espécies mais distantes (*A. desouzai* e *A. deanei*) para o marcador ribossomal. O marcador gGAPDH mostrou maiores porcentagens de divergência, chegando até 8% entre espécies mais distantes (*A. desouzai* e *A. deanei*) e 4% entre espécies próximas (*A. ambiguus* e *A. desouzai*) (Anexo II).

O mesmo padrão foi observado no estudo de re-descrição do gênero *Herpetomonas* realizado por Borghesan e colaboradores (2013). Em espécies próximas, como por exemplo *Herpetomonas ztiplika* e *Herpetomonas trimorpha*, apresentaram apenas 0,6% de divergência genética na análise do gene SSUrRNA, enquanto que apresentaram 7% de divergência na análise do marcador gGAPDH. Espécies distantes, como é o caso de *Herpetomonas mariadeanei* e *Herpetomonas wanderleyi*, apresentaram 8% de divergência genética para o marcador ribossomal e 18% de divergência genética para o gene gGAPDH (Borghesan *et al.*, 2013) (Anexo III). Vale ressaltar que um trabalho posterior realocou a espécie *H. mariadeanei* em um novo gênero, *Lafontella* (Yurchenko *et al.*, 2016). Isso indica que o alto valor de divergência genética apresentado entre as espécies de *Herpetomonas* seriam, na verdade, um limiar para sugerir que sejam gêneros distintos (Anexo III).

Na descrição de novas espécies é possível observar um limiar parecido como aquele encontrado entre as espécies de *Herpetomonas*. Yurchenko e colaboradores (2016) descrevem uma nova espécie de *Herpetomonas*: *Herpetomonas taranka*. Nossas análises mostraram que a nova espécie se sustenta com pelo menos 9% de divergência genética do marcador gGAPDH quando comparada com a espécie mais próxima, *Herpetomonas samueli*, e até 5% com a mesma espécie para o gene ribossomal (Anexo III).

Na descrição de novos gêneros, são necessários o uso de outros alvos moleculares, bem como outras ferramentas taxonômicas, como por exemplo a observação da morfologia. Entretanto, a fim de estabelecer um limiar para separar novos gêneros, dentro da proposta de DNA *barcoding*, nós alinhamos e analisamos as sequências de algumas espécies de diferentes gêneros disponíveis em banco de dados para os alvos gGAPDH e SSU. Essas análises podem ser vistas na tabela em anexo (IV). Foi possível observar uma divergência genética de pelo menos 11% para ambos os marcadores na separação de gêneros.

A partir dos valores observados na reanálise dos dados de literatura que realizamos, convencionamos para este trabalho considerar como espécies distintas aquelas que apresentam, em comparações par-a-par, pelo menos 2% de divergência genética para o alvo molecular SSUrRNA e mais de 4% para o alvo gGAPDH.

As análises de limiar de distâncias entre gêneros e espécies não foram realizadas para o marcador mitocondrial (COI). Isso porque não há banco de dados disponível para o marcador. O uso deste marcador no nosso trabalho ficou restrito a avaliação da congruência dos resultados em comparação aos marcadores mais utilizados. Como já fora mencionado anteriormente, COI se mostrou tão resolutivo quanto gGAPDH e SSU na distinção entre espécies e gêneros, apresentando apenas ~2% de divergência genética entre espécies próximas (Figuras 12 e 13, Anexo I).

### **3. Análise de distância e análise filogenética**

As árvores geradas pelo algoritmo de NJ para cada marcador estão representadas pelas figuras 8, 10 e 12. As chaves ao lado direito da figura, seguidas de um binômio taxonômico, indicam clados que representam uma unidade de tipagem (TU – *Typing unit*) (Westenberger *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2011). As Figuras 9, 11 e 13 representam as árvores geradas pelo método probabilístico de ML, onde os espécimes que representam TUs únicas foram colapsados e indicados por um triângulo. A Tabela 6, lista o código das sequências do banco de dados Genbank utilizadas para alinhamento e comparação com as sequências do nosso acervo. A utilização da metodologia de NJ com o modelo de distância K2-p foi utilizada com base na proposta do método de DNA *Barcoding* para a identificação de espécies. No entanto, diversos autores têm utilizado também análises filogenéticas para o melhor entendimento das relações entre os organismos desta família e descrição de novas espécies. Sendo assim, além da abordagem utilizada pelo DNA

*Barcoding*, nós realizamos uma análise filogenética utilizando o método de ML para respaldar e dar confiabilidade aos nossos dados filogenéticos.

Ambas as análises foram congruentes para quase todos os grupos estudados. Contudo, foi possível observar incongruências em algumas análises para o marcador SSUrRNA. Sequências de *Phytomonas serpens* foram agrupadas em um clado monofilético na análise de NJ, enquanto que nas análises por ML a espécie se distribuiu em dois clados. No entanto, os valores de *bootstrap* foram extremamente baixos para estes ramos (8 e 7%), indicando que não são grupamentos verdadeiros. Adicionalmente foram observados nas reconstruções filogenéticas por ML clados pouco sustentados (baixos valores de *bootstrap*) que agruparam mais de uma espécie válida de tripanossomatídeos, ao contrário do observado nas árvores de distância (Figura 11).

#### **4. Curadoria, revisão taxonômica e identificação dos isolados**

##### **4.1. Levantamento histórico dos depósitos, seleção de organismos e resultados obtidos.**

Com o intuito de realizar um resgate histórico da Coleção de Protozoários da Fiocruz, nós realizamos uma intensa pesquisa de todos espécimes que foram utilizados nesse trabalho. Para isto, foram realizadas consultas ao livro tomo da coleção, pesquisas em artigos científicos, além de conversas com os próprios depositantes, quando possível. Esta estratégia visou publicizar o acervo e aumentar a rastreabilidade de cada depósito, tornando a identificação molecular mais útil para a comunidade científica. Como resultado, nós conseguimos atualizar o banco de dados interno, o sicol, com 167 registros. Cada registro apresenta informação curada. Essas informações são cruciais na manutenção da coleção, além de permitirem uma rastreabilidade das amostras e confiabilidade dos depósitos para futuros trabalhos. Além disso, nós disponibilizamos 88 registros para acesso público online, disponíveis no site da coleção (<http://colprot.fiocruz.br/>).

Para amostras que foram realizadas a extração de DNA, 97 foram amplificadas com sucesso para o alvo gGAPDH, gerando um alinhamento confiável com aproximadamente 800 pb; 72 foram amplificadas com sucesso para o alvo V7V8, gerando um alinhamento confiável de aproximadamente 700 pb; e 50 foram amplificadas com sucesso para o alvo COI, gerando um alinhamento confiável de aproximadamente 500 pb.

É importante esclarecer que nem todas as amostras que tiveram seu DNA extraído foram analisadas, seja por razões metodológicas (dificuldade de amplificação do marcador ou dificuldade em gerar sequências passíveis de serem alinhadas), ou incongruências taxonômicas observadas durante a análise dos alinhamentos e árvores. Apenas 21 amostras do total de DNA extraídos (N=119) não integraram esta curadoria.

#### 4.2. Curadoria do acervo COLPROT

As identidades taxonômicas de 45 depósitos foram confirmadas com base nas análises de um fragmento do gGAPDH, 31 da região ribossomal V7V8 e 12 do fragmento de COI (Figura 14- a) (Tabela 7). A partir das análises das sequências de gGAPDH, foi possível identificar 29 depósitos que não haviam sido descritos previamente, assim como 24 amostras com o alvo V7V8 e 7 com o alvo COI (Figura 14- b) (Tabela 8). A revisão taxonômica de 13 depósitos da coleção também foi possível. As análises realizadas com o marcador gGAPDH permitiram a revisão e redescrição de 13 espécies; a partir das análises das regiões V7V8 conseguimos identificar 11 espécies passíveis de revisão e 9 quando o fragmento de COI foi analisado (Figura 14- c) (Tabela 9). Além disso, dois depósitos foram identificados como espécies novas e dois depósitos candidatos a novos gêneros. Entretanto serão necessárias outras análises para confirmar estes achados.

Tabela 7- Total de depósitos que tiveram a identidade taxonômica confirmadas separados por gêneros.

Confirmação taxonômica	
GÊNERO	TOTAL
<i>Crithidia</i>	18
<i>Leptomonas</i>	05
<i>Angomonas</i>	05
<i>Strigomonas</i>	04
<i>Phytomonas</i>	05
<i>Herpetomonas</i>	06
<i>Kentomonas</i>	01
<i>Lafontella</i>	01
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>

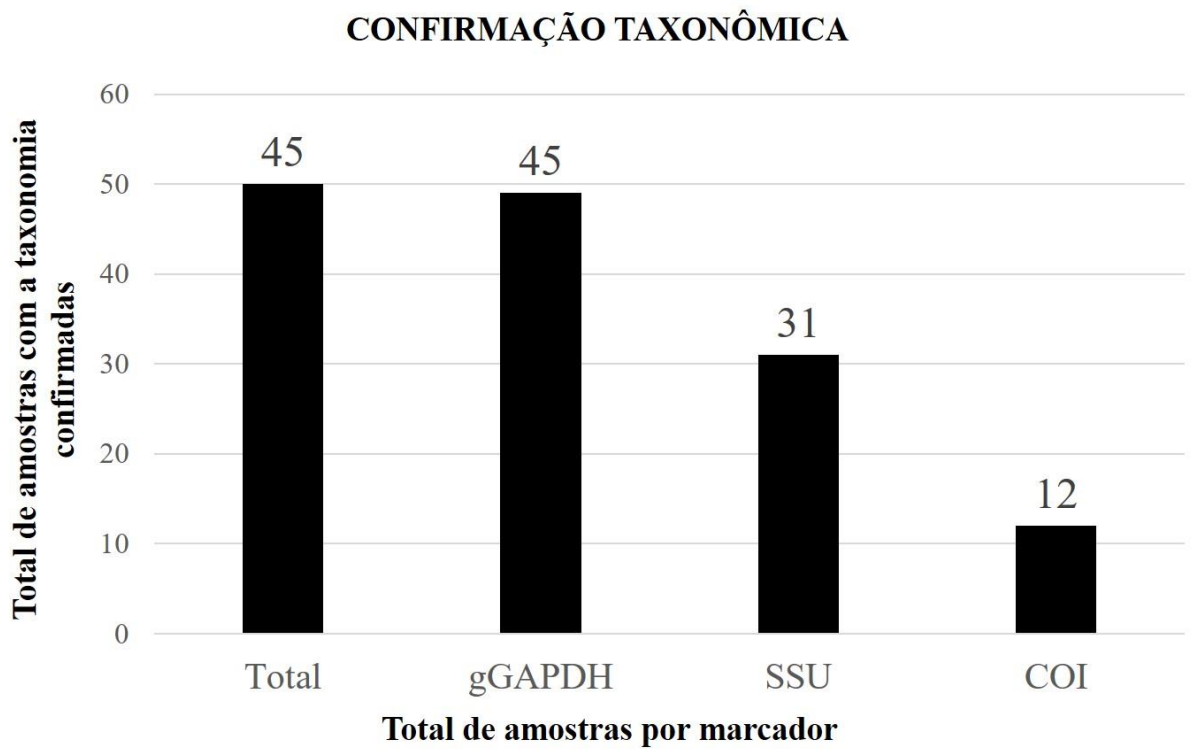
Tabela 8- Total de depósitos que foram identificados de acordo com sua taxonomia separados por gêneros.

Identificação taxonômica	
GÊNERO	TOTAL
<i>Crithidia</i>	06
<i>Leptomonas</i>	04
<i>Angomonas</i>	02
<i>Phytomonas</i>	08
<i>Herpetomonas</i>	09
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>

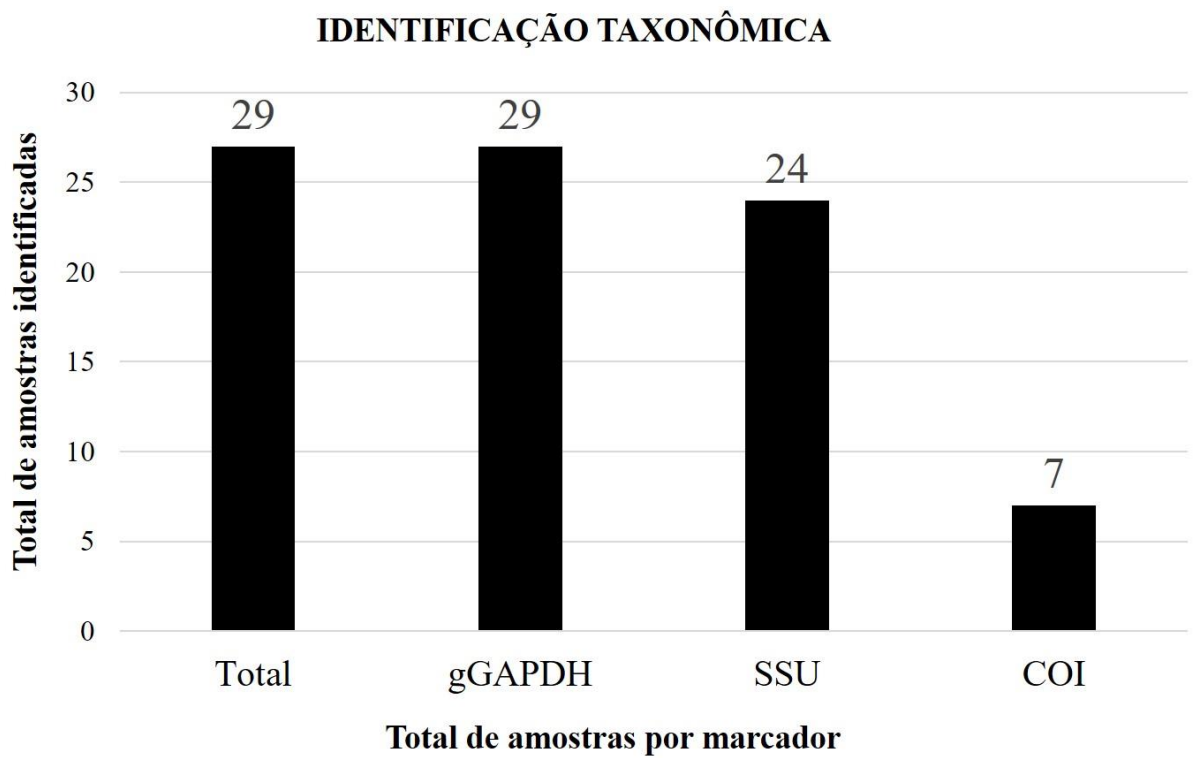
Tabela 9- Espécies de tripanossomatídeos depositadas na COLPROT que tiveram sua taxonomia revista. A Coluna da esquerda apresenta as descrições originais das espécies enquanto que a coluna da direita mostra a nomenclatura revisada após análises moleculares.

ORIGINAL	ATUALIZADA
<i>Crithidia confusa</i>	<i>Crithidia thermophila</i>
<i>Crithidia hutneri</i>	
<i>Leptomonas bifurcata</i>	
<i>Crithidia ricardo</i>	<i>Crithidia fasciculata</i>
<i>Crithidia guilhermei</i>	
<i>Crithidia luciliae</i>	
<i>Crithidia acanthocephali</i>	<i>Crithidia flexonema</i>
<i>Leptomonas acus</i>	<i>Leptomonas tarcoles</i>
<i>Leptomonas spiculata</i>	
<i>Leptomonas lactosovorans</i>	<i>Herpetomonas samueli</i>
<i>Leptomonas wallacei</i>	
<i>Herpetomonas anglusteri</i>	<i>Herpetomonas samuelpeessoai</i>
<i>Herpetomonas mcghee</i>	<i>Phytomonas serpens</i>

a)



b)



c)

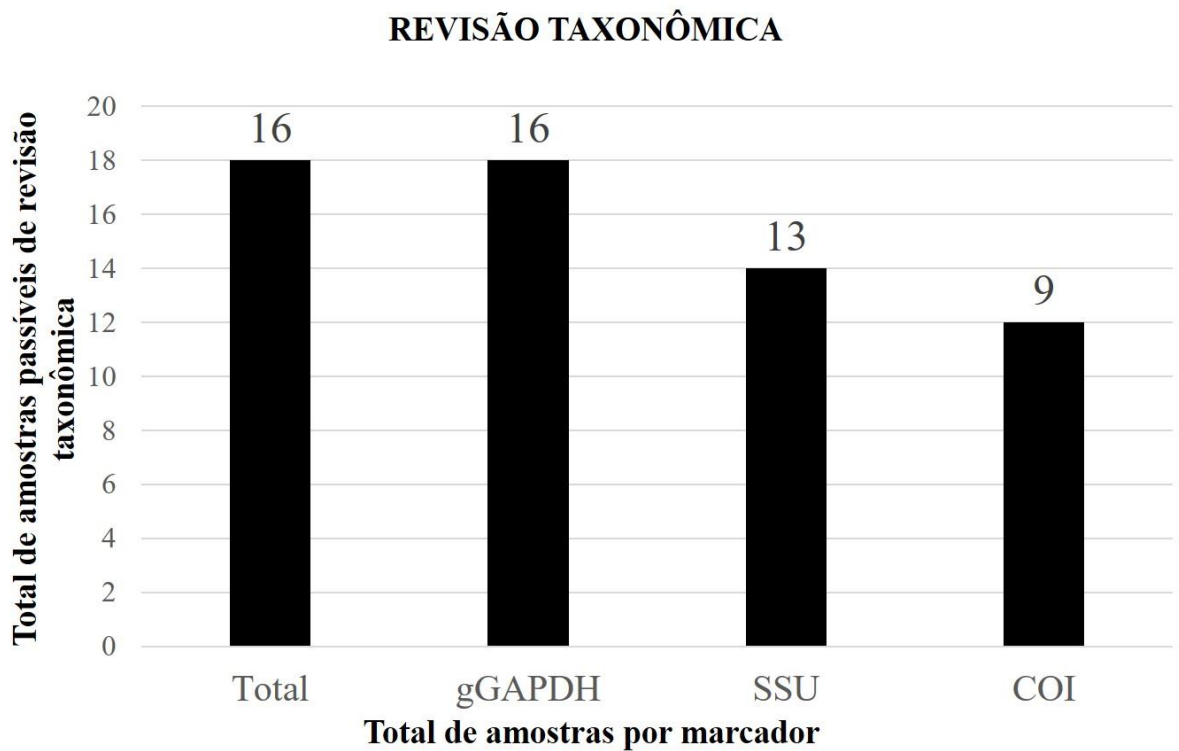


Figura 14- Resultados obtidos a partir da análise dos genes gGAPDH, SSUrRNA e COI. As figuras a, b e c mostram o total de espécies que tiveram sua identidade taxonômica confirmadas, identificadas e aquelas que foram passíveis de alguma revisão respectivamente.

Por tudo apresentado, fica evidente que a curadoria de coleções biológicas de uma maneira geral merece atenção. As coleções servem, muitas vezes, como banco de dados ou de material para diversos trabalhos científicos. É crucial que uma coleção biológica tenha o seu acervo de forma acessível e confiável para os usuários. Pela primeira vez, durante a realização deste trabalho, a coleção de protozoários passou por uma ampla curadoria de seus depósitos com a utilização de dados moleculares em conjunto com as informações já disponíveis e graças a isso foi possível identificar os isolados passíveis de redescrição. Os depósitos foram feitos principalmente para a preservação do material e, em alguns casos, para que fosse realizada uma caracterização. Ainda é possível enaltecer a importância dos bancos de sequências na curadoria das coleções. Sem o banco de dados, não haveria como confirmar com confiança a identidade dos depósitos. Todos os resultados de curadoria da COLPROT estão compilados na tabela 6.



Visto a abundância de informações geradas a partir das nossas análises, nós decidimos (para o melhor entendimento do leitor) que os resultados fossem discutidos separadamente por gênero.

### 4.3. *Crithidia*

O gênero *Crithidia* foi caracterizado inicialmente como tripanossomatídeos de insetos que apresentavam formas coanomastigotas em seu ciclo de vida (Figura 2) (Hoare & Wallace, 1966; Wallace, 1966; Camargo 1992). Porém, análises filogenéticas anteriores revelaram que este grupo é polifilético (Teixeira *et al.*, 2011; Yurchenko *et al.*, 2014).

A partir do conjunto de resultados, pôde-se observar que o grupo que inclui as espécies *Crithidia luciliae thermophila*, *Crithidia hutneri* e *Crithidia confusa* se agrupam em um mesmo clado monofilético, e não apresentam divergência genética entre si para os três marcadores moleculares analisados (Figuras 8-13, 15-17, Anexo I). Trabalhos anteriores já haviam reportado a similaridade bioquímica e molecular entre as espécies *C. hutneri* e *C. luciliae thermophila*. Isaac Roitman e colaboradores (1977) e de Sá e colaboradores (1980) demonstraram que ambas as espécies eram cultiváveis em meio quimicamente definido com temperatura variando entre 15-37 °C e com comportamento em cultivo muito similar. A análise de *riboprinting* de SSU rRNA analisado pela PCR também indicou que essas espécies de *Crithidia* são próximas (Clark, 1997). Baseados em dados da literatura e em nossos resultados, sugerimos que essas espécies sejam sinonimizadas em uma única espécie: *Crithidia luciliae thermophila*, de acordo com as normas da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). Visto que esta subespécie apresenta alta divergência genética com a espécie *Crithidia luciliae* (pelo menos 4% para todos os marcadores analisados), sugerimos que esta ganhe status de espécie e seja renomeada em *Crithidia thermophila*. Outro depósito da coleção de protozoários da Fiocruz, COLPROT 056, isolado de *Zelus leucogrammus* (Hemiptera), e COLPROT 703 isolado de *Cyrtoneuropsis conspersa* (Diptera) que aguardavam identificação também não apresentam divergência genética e formam um clado monofilético com este grupo para os marcadores analisados, sendo possível a identificação taxonômica destes depósitos como *C. thermophila*. Vale destacar que este foi um dos primeiros resultados do nosso grupo de pesquisa que indicou a necessidade de sinonimização dessas espécies.

Para garantir a acurácia dos nossos achados e testarmos a rastreabilidade e confiabilidade do acervo da Coleção, cuja curadoria assumimos em 2010, nós obtivemos diretamente da ATCC (*American Type Culture Collection*) novas

amostras de *C. hutneri* (COLPROT 688) e *C. lucilae thermophila* (COLPROT 689). As análises dessas amostras confirmaram as observações anteriores (Figuras 8-13, 15-17, Anexo I). Um desdobramento importante desta realocação é a possibilidade de discutir e investigar a ocorrência desta espécie em diferentes regiões geográficas, além da sua promiscuidade de hospedeiros (Tabela 6).

A espécie *C. confusa* foi descrita por Jirků (Jirků *et al.*, 2012) e ganhou este nome para representar a situação “confusa” da espécie identificada como *A. deanei*, depositada na ATCC (ATCC 30255) e no banco de dados Genbank (gGAPDH EF546792) descrita e depositada por Yurchenko e colaboradores como *C. deanei* (Yurchenko *et al.*, 2008). Já fora discutido em outros trabalhos que esta cepa de *A. deanei* claramente não representa a espécie original (depositada na COLPROT 044 e TCC-USP 036E, *Trypanosomatidae Culture Collection*-Universidade de São Paulo) e análises feitas pelos autores com RNA SL mostraram que este táxon era parafilético em relação aos outros isolados da mesma espécie e tinha similaridade com *C. lucilae thermophila* (Fernandes *et al.*, 1997; Yurchenko *et al.*, 2009). Em nossas análises, a sequência identificada como sendo de *A. deanei* depositada no Genbank (EF546792) foi agrupada no mesmo clado monofilético de *C. lucilae thermophila* quando o marcador gGAPDH foi analisando, apresentando apenas 1% de divergência genética. Este resultado mostra a necessidade de correção na nomenclatura do depósito do Genbank, que claramente não corresponde a espécie mencionada.

Fica evidente que as sequências no *Genbank* necessitariam passar por uma curadoria, entretanto, as políticas desse banco de dados permite que apenas o responsável pelo depósito possa alterar os registros, e muitas vezes, o depositante deixou de estudar esse tópico, se aposentou, ou até mesmo faleceu. De certa forma, essa é uma maneira de preservar registros históricos importantes. Portanto, taxonomistas devem realizar uma análise criteriosa antes de extrapolar relações de proximidade entre organismos a partir da análise de sequências de DNA e este banco de dados.

A sequência da espécie *Leptomonas bifurcata* depositada no banco de dados (gGAPDH DQ910928 e SSU DQ910925) agrupou em um clado monofiléticos com os isolados da espécie de *C. lucilae thermophila* e apresentou 1% de divergência genética com este grupo de *Crithidia* para o alvo gGAPDH e nenhuma divergência para SSU (Figuras 8-11, 15 e 16 Anexo I). Yurchenko e colaboradores (2008) isolaram este tripanossomatídeo de um hemíptero da Costa Rica e, apesar de terem nomeado como uma nova espécie de *Leptomonas*, análises de RNA SL feitas pelos autores mostraram que havia

similaridade com a espécie equivocada de *A. deanei* e *C. luciliae thermophila*. Nossos resultados corroboram o resultado anterior, indicando a necessidade de revisão taxonômica desta espécie para torná-la sinônimo de *C. thermophila*.

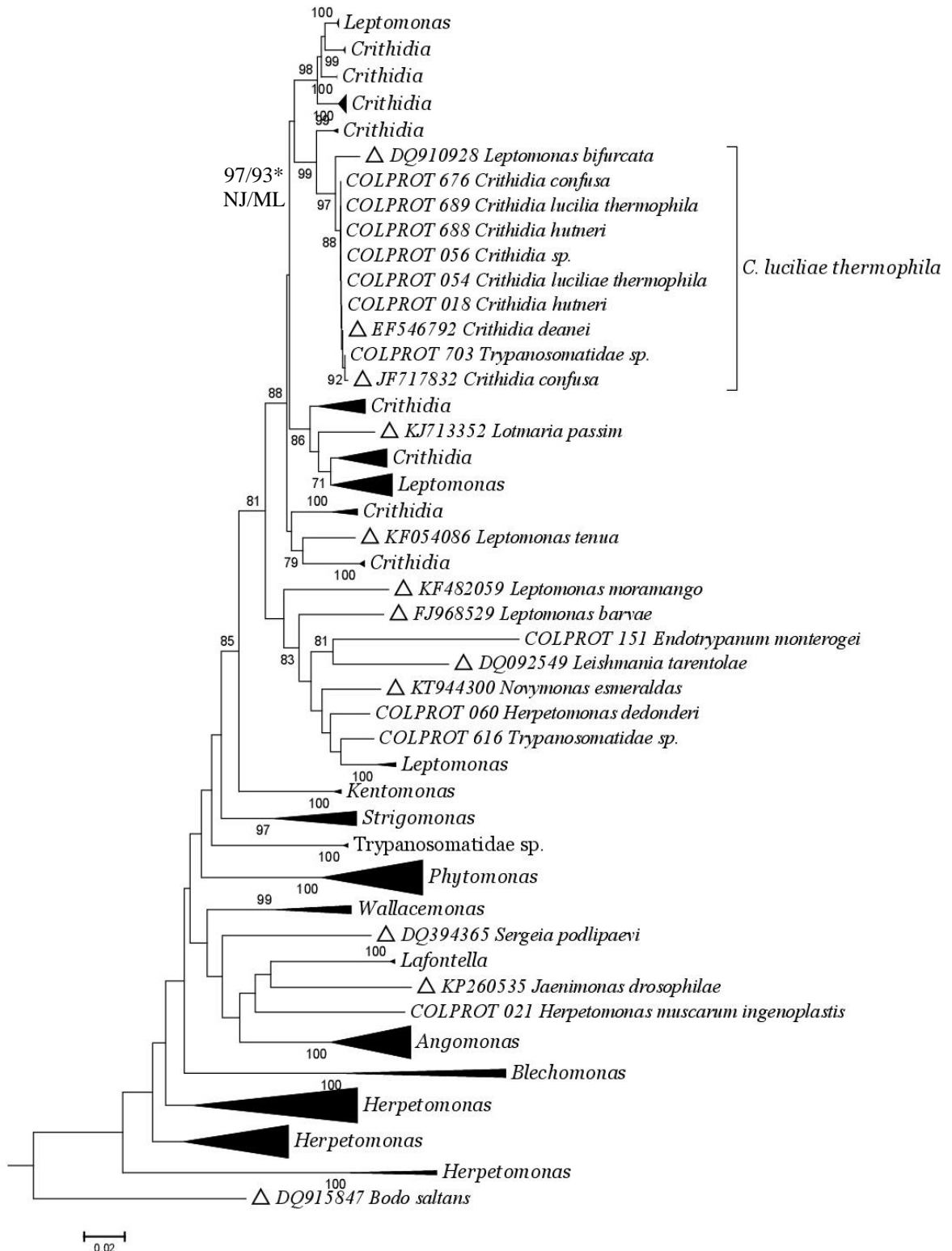


Figura 15- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia luciliae thermophila*. O (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

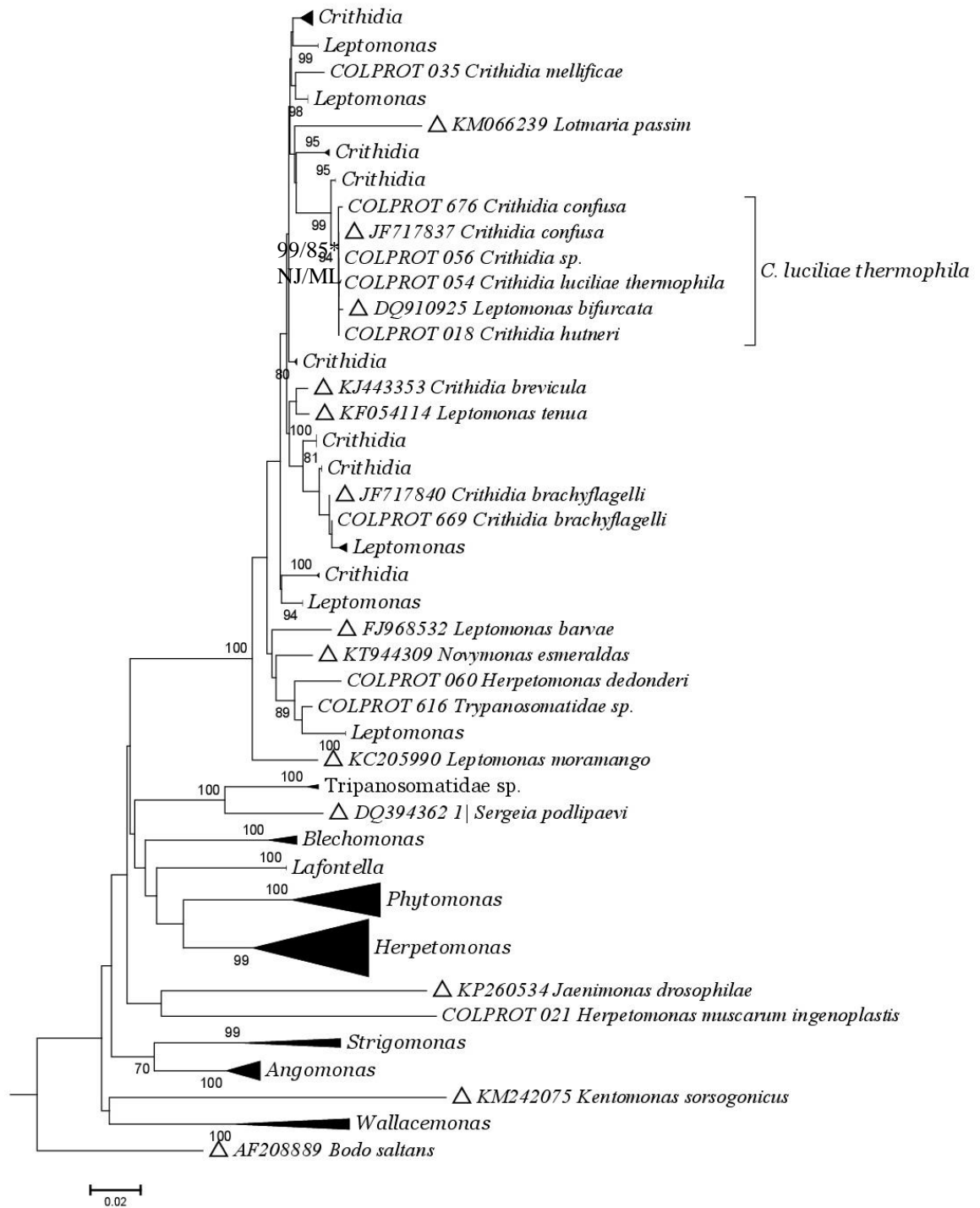


Figura 16- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia luciliae thermophila*. O (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

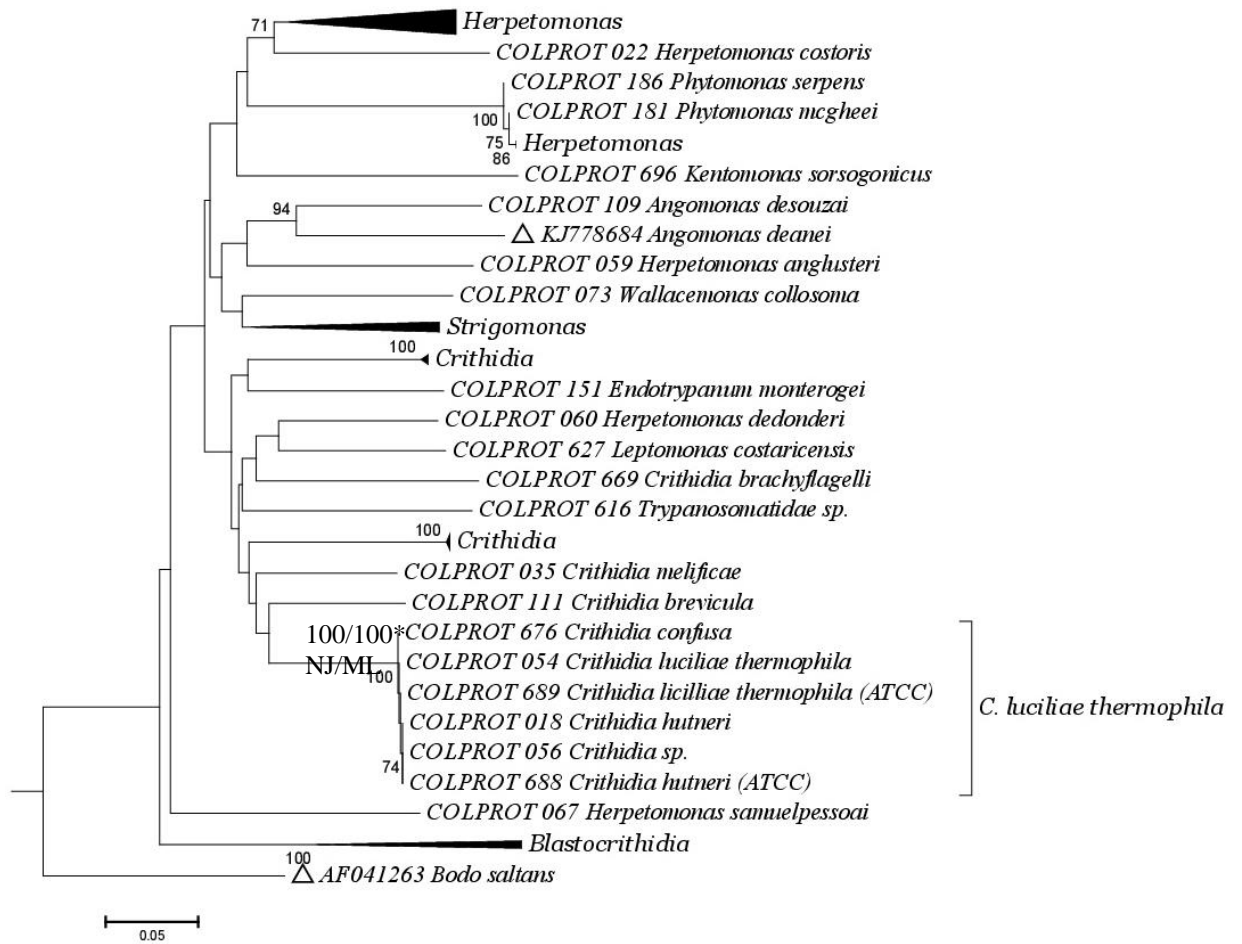


Figura 17- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o grupo que inclui a espécie *Crithidia luciliae thermophila*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

*Crithidia fasciculata* é a espécie-tipo do gênero, descrita por Léger (1902) e é uma das espécies mais utilizadas para o estudo de organização e replicação do kDNA, ultraestrutura e bioquímica (Guilbride & Englund, 1998; Morris *et al.*, 2001). As espécies *Crithidia luciliae* e *C. fasciculata* foram descritas como espécies parafilética (Wallace, 1966). Porém, análises com enzimas de restrição indicaram uma homologia superior a 96% entre os maxicírculos dessas espécies, sugerindo uma sinonimização para *C. fasciculata* (Hoeijmakers *et al.*, 1982). Em 1993, Alexander Sibajev e colaboradores (1993) descreveram *Crithidia ricardoï* como uma nova espécie do gênero *Crithidia* através de microscopia eletrônica de transmissão e perfil de isoenzimas e de restrição do kDNA. *C. guilhermei* foi descrita por Soares e colaboradores (1986) a partir do isolamento em *Phaenicia cuprina* (Diptera). Dados de morfometria obtidos pela observação em microscópio óptico indicaram que se tratava de uma espécie de *Crithidia*, porém esta era menor do que a espécie já descrita anteriormente *C. luciliae*. A espécie foi descrita pela observação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão. As características morfológicas e estruturais observadas, além dos resultados de isoenzimas não deixavam dúvidas de que se tratava de uma espécie de *Crithidia*, e as ferramentas disponíveis sugeriram que fosse uma nova espécie (Soares *et al.*, 1986).

Nossos resultados mostram que as espécies *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *C. ricardoï* e *C. guilhermei* formam um clado monofilético pelas análises filogenéticas e apresentam baixa divergência genética entre si (nenhuma divergência para o marcador COI e SSU e entre 0 e 1% para o marcador gGAPDH) e, portanto, sugerimos que sejam sinonimizadas em *C. fasciculata* de acordo com ICZN (Figuras 8-13 18-20, Anexo I). Além desses, um isolado de lesão cutânea em humano, proveniente de Cusco (Perú) (COLPROT 606), cujas características de cultivo e perfil de isoenzimas impossibilitaram sua classificação como *Leishmania braziliensis* (que é espécie frequente para este tipo de lesão na região do isolamento) e outro isolado de *Chamaesyce thymifolia* (Malpighiales) (COLPROT 213), não apresentou divergência genética com o grupo para nenhum dos marcadores utilizados, e formaram um clado monofilético, permitindo a identificação taxonômica desses depósitos como *Crithidia fasciculata* (Figuras 8-13 18-20, Anexo I).

Embora o pressuposto teórico não preveja tripanossomatídeos monoxênicos como patógenos de vertebrados, os relatos de infecção em humanos ocasional com esses parasitos vêm aumentando paulatinamente. Os achados são principalmente em pacientes HIV positivos e na co-infecção com espécies de *Leishmania*. Isso nos leva a crer que espécies normalmente não

infecciosas podem explorar novos nichos ecológicos em vertebrados, sobretudo nos indivíduos que apresentam alguma deficiência em seu sistema imunológico (Dedet *et al.*, 1995; Jimenez *et al.*, 1996; Pacheco *et al.*, 1998; Dedet & Pratlong, 2000; Miller, 2000; Ferreira & Borges, 2002; Chicharro & Alvar, 2003).

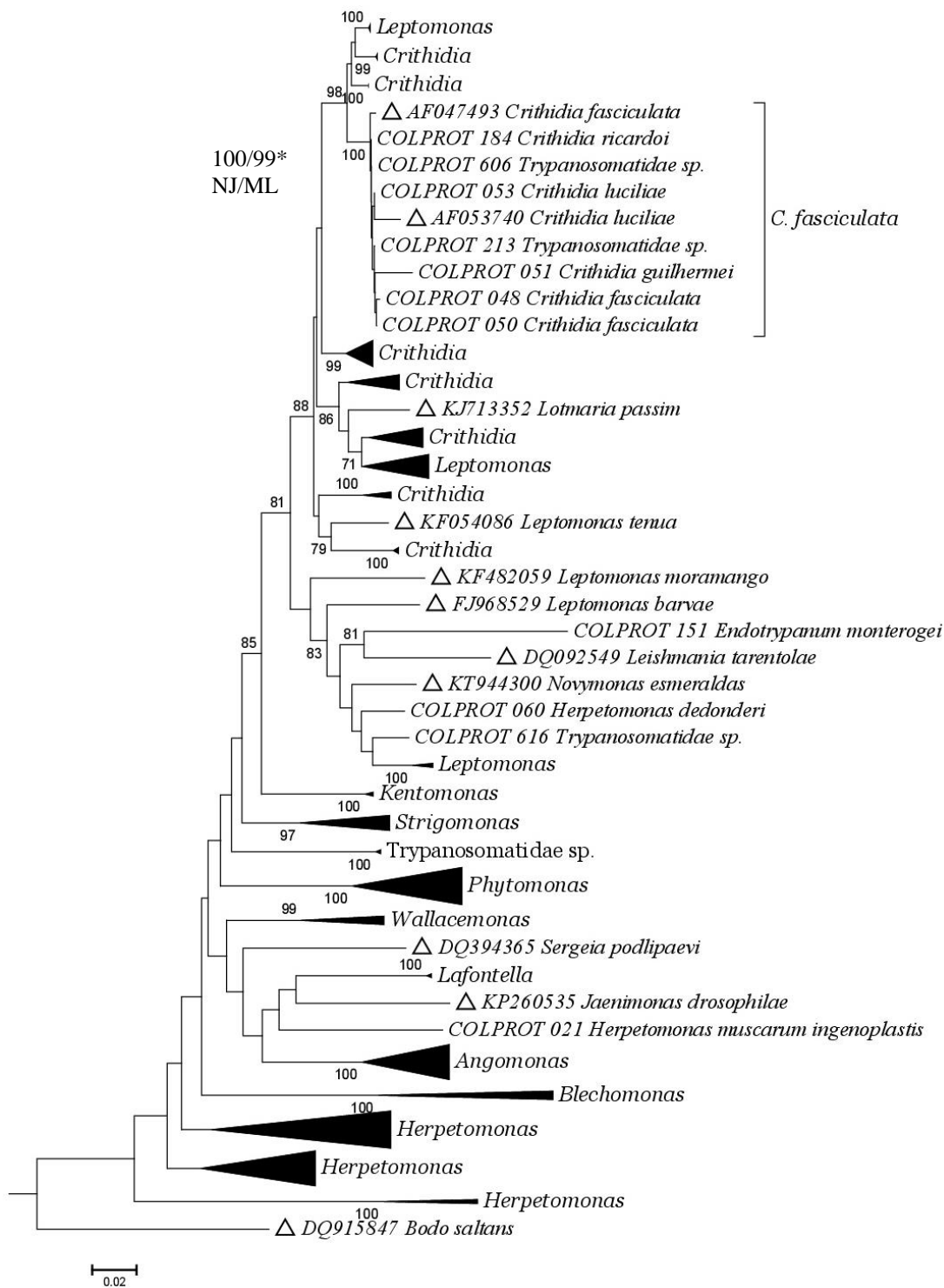
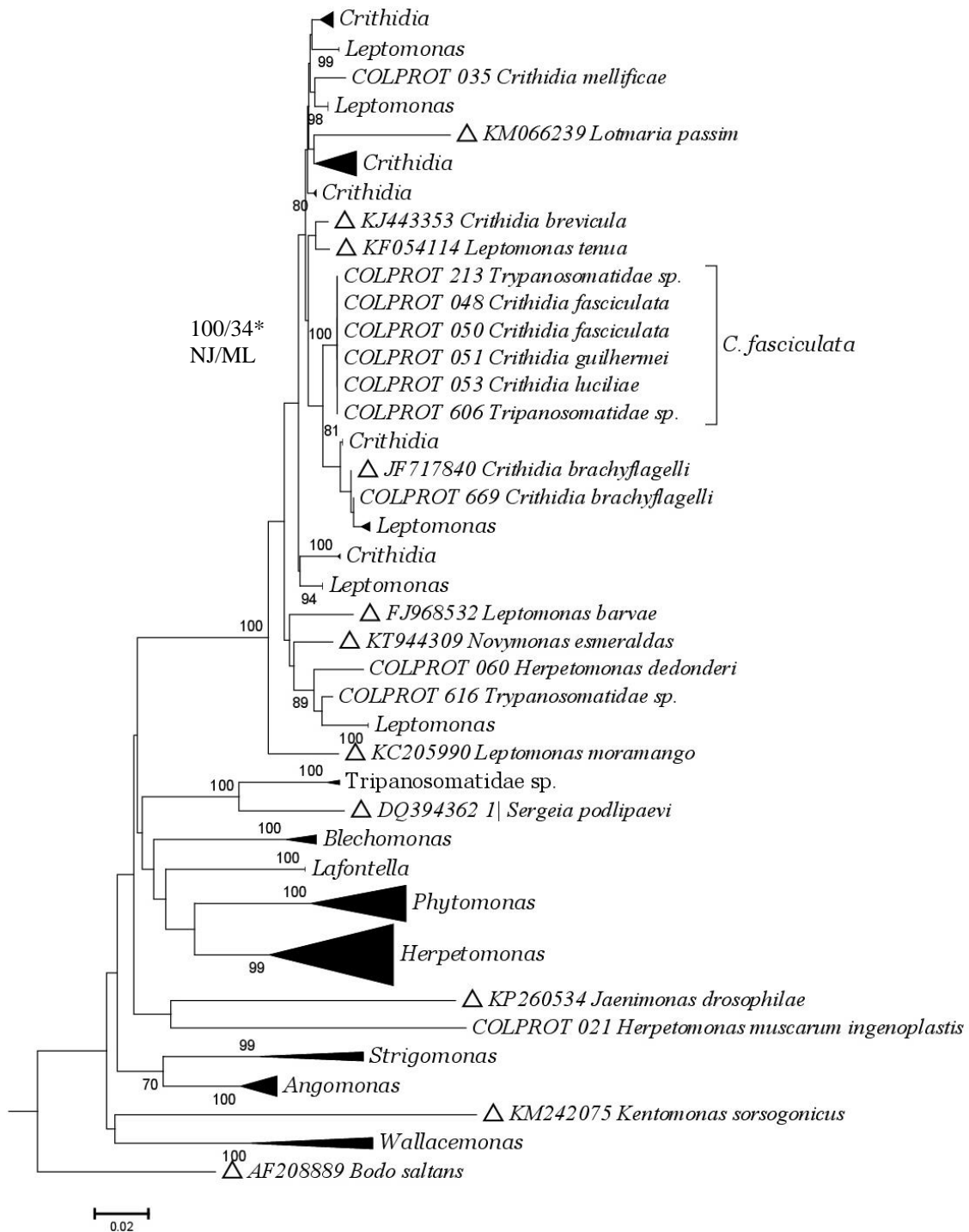


Figura 18- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.



Fiura 19 - Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.



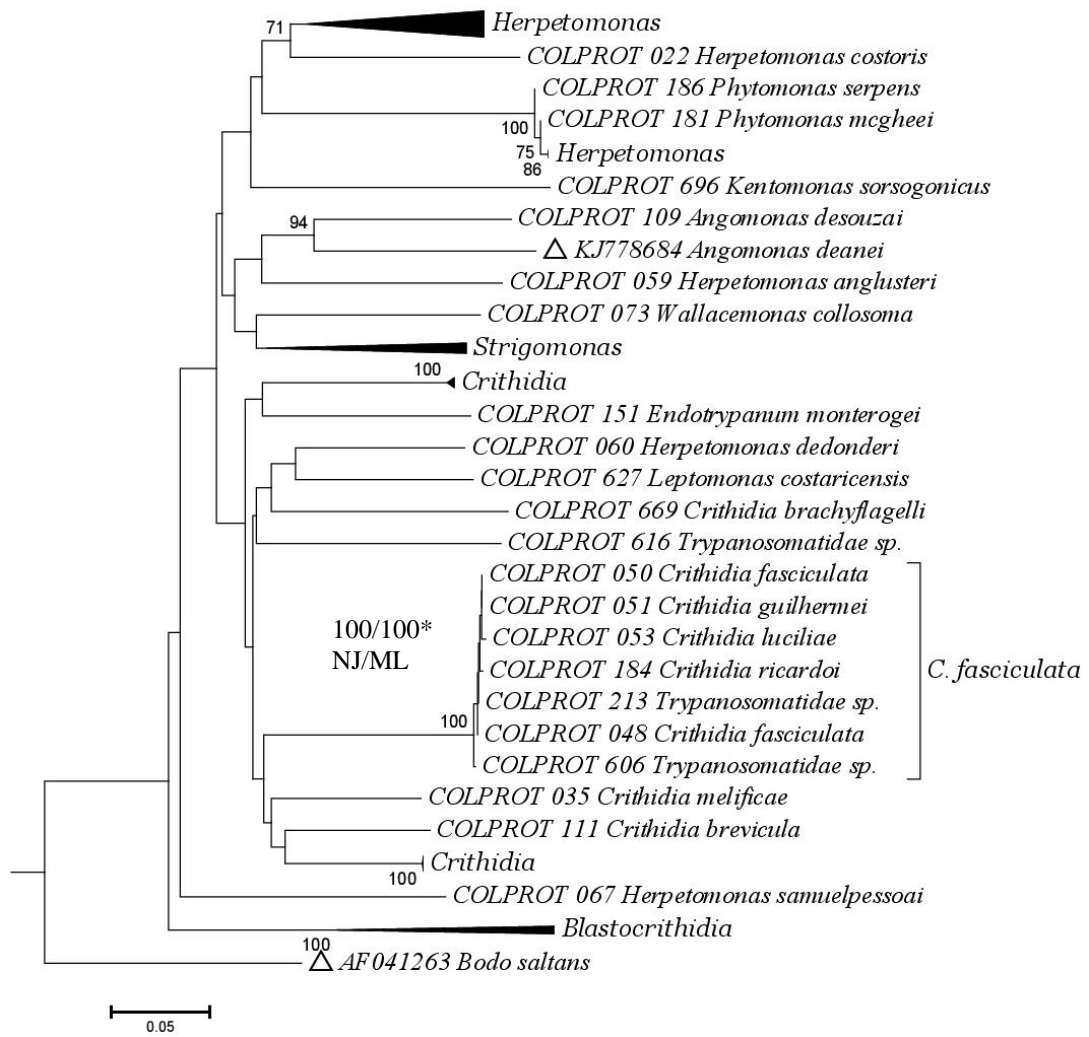


Figura 20- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o grupo que inclui a espécie *Crithidia fasciculata*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Outras espécies que devem ser sinonimizadas são *Crithidia flexonema* (COLPROT 016), isolada de *Gerris remigis* (Hemiptera) em 1960 nos Estados Unidos pelo Dr. Truman B. Clark (Wallace *et al.*, 1960) e *Crithia acanthocephali* (COLPROT 042), isolada de *Acanthocephala femorata* (Hemiptera) em 1959, nos Estados Unidos, pelo Dr. R. Barclay McGhee (Hanson & McGhee, 1961), pois não apresentaram divergência genética para os marcadores gGAPDH e SSUrRNA. Um isolado não identificado e sem descrição de depósito (COLPROT 254) também não apresentou divergência genética com essas espécies. As três espécies supracitadas formam um clado monofilético bem definido. Apesar de *C. acanthocephali* ter sido coletada em 1959, a publicação do artigo com a descrição da espécie foi apenas em 1961. Sendo assim, de acordo com a ICZN, a sinonimização deverá ser feita de acordo com a espécie descrita primeiramente: *C. flexonema* (Wallace *et al.*, 1960) (Figuras 8-11, 21 e 22, Anexo I).

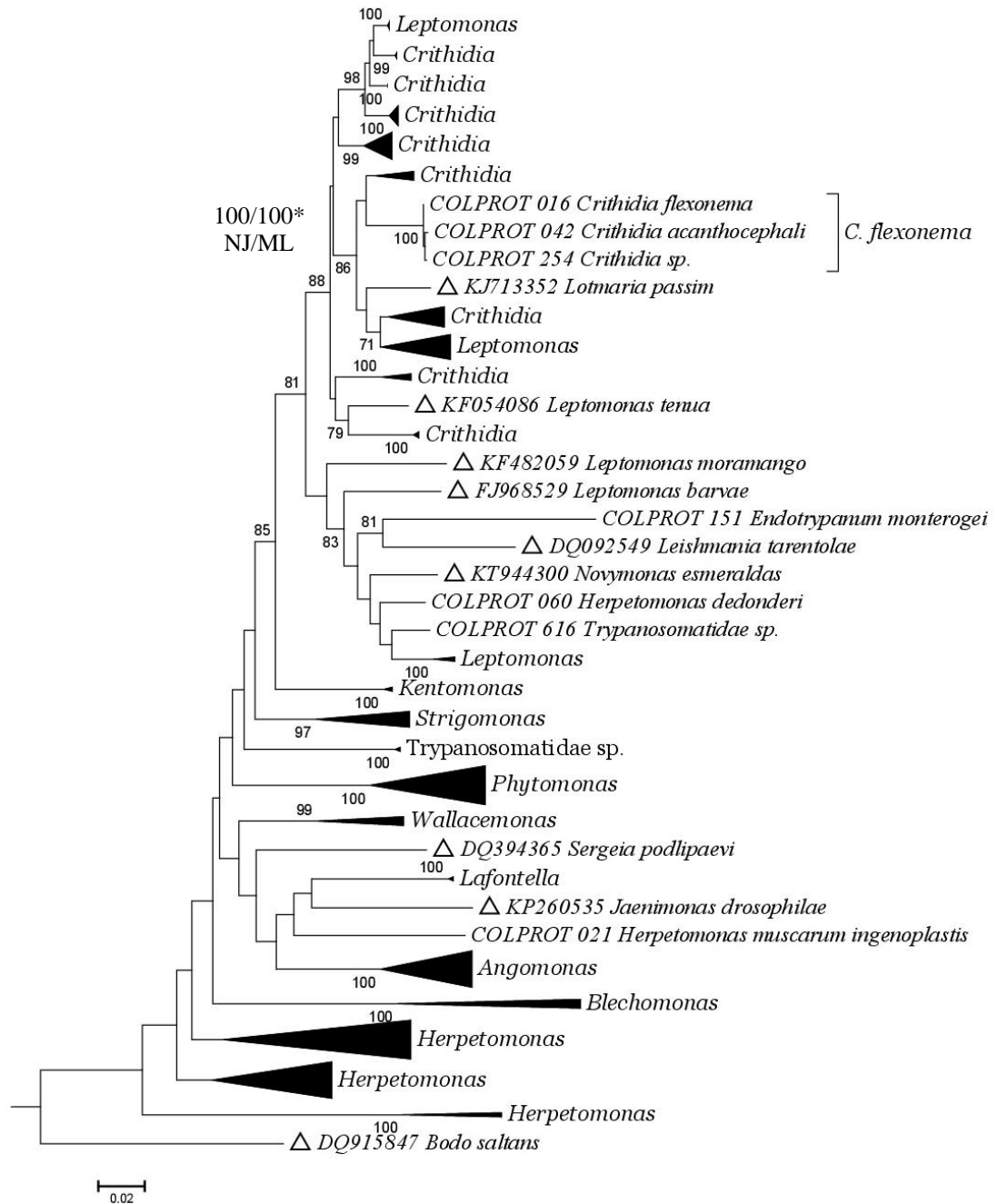


Figura 21- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia flexonema*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

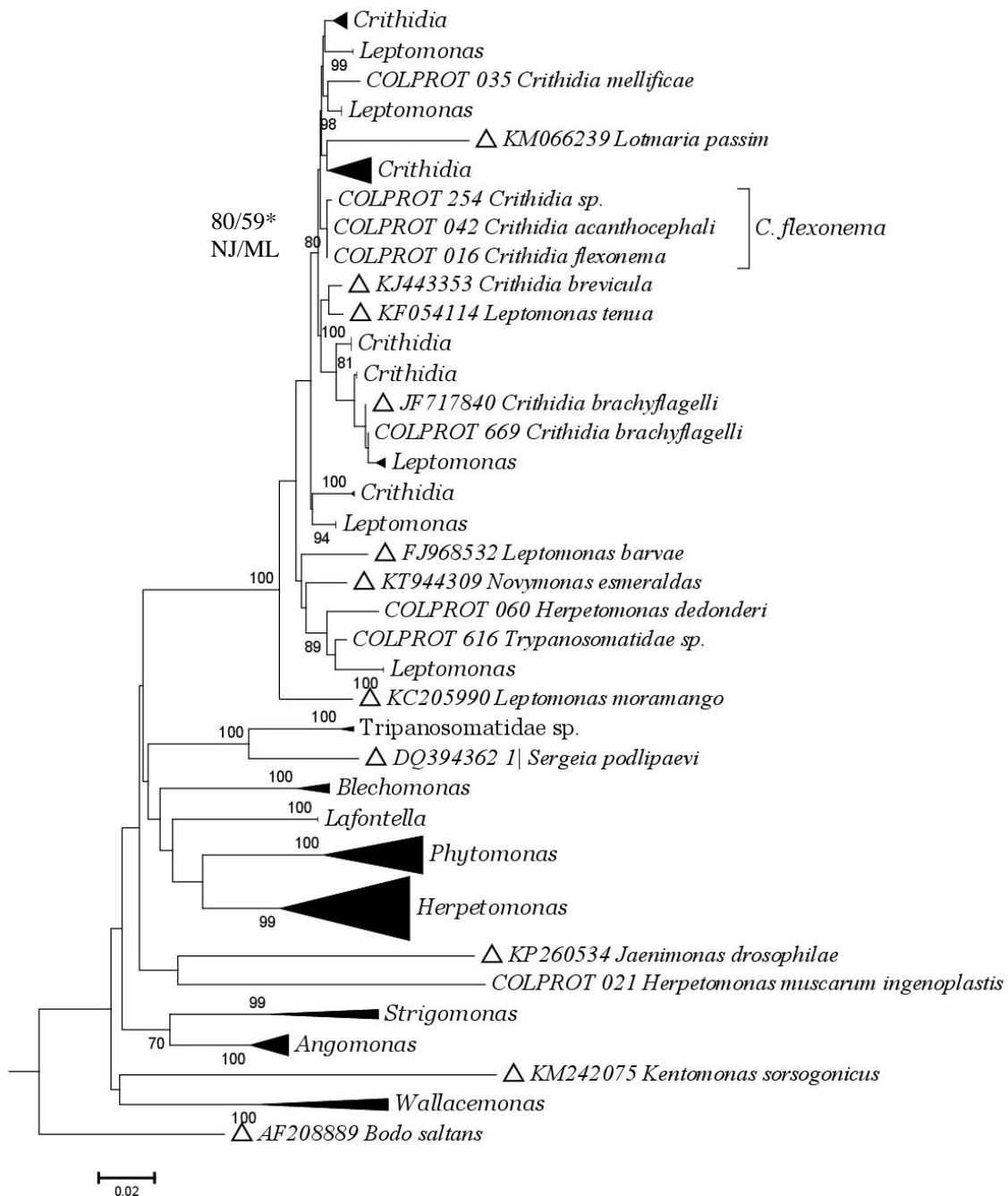


Figura 22- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia flexonema*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Os resultados do sequenciamento dos genes gGAPDH e SSUrRNA também permitiram a identificação taxonômica de um espécime depositado na COLPROT (628) pelo Dr. Philippe Grellier (Coleção de Eucariotos Unicelulares do Museu Nacional de História Natural de Paris (MNHN)). O depósito foi isolado de *Pleogaster* sp. (Reduviidae) e as análises dos dados possibilitou a observação do agrupamento deste isolado com a espécie *Crithidia otongatchiensis* em um clado monofilético, e sem divergência genética, indicando que seja um isolado desta espécie (Figuras 8-11, 23 e 24, Anexo I), espécie descrita por Votýpka e Lukeš (Votýpka *et al.*, 2012a; Yurchenko *et al.*, 2014), isolada de *Rhynocoris rapax* (Heteroptera: Reduviidae) no Equador.

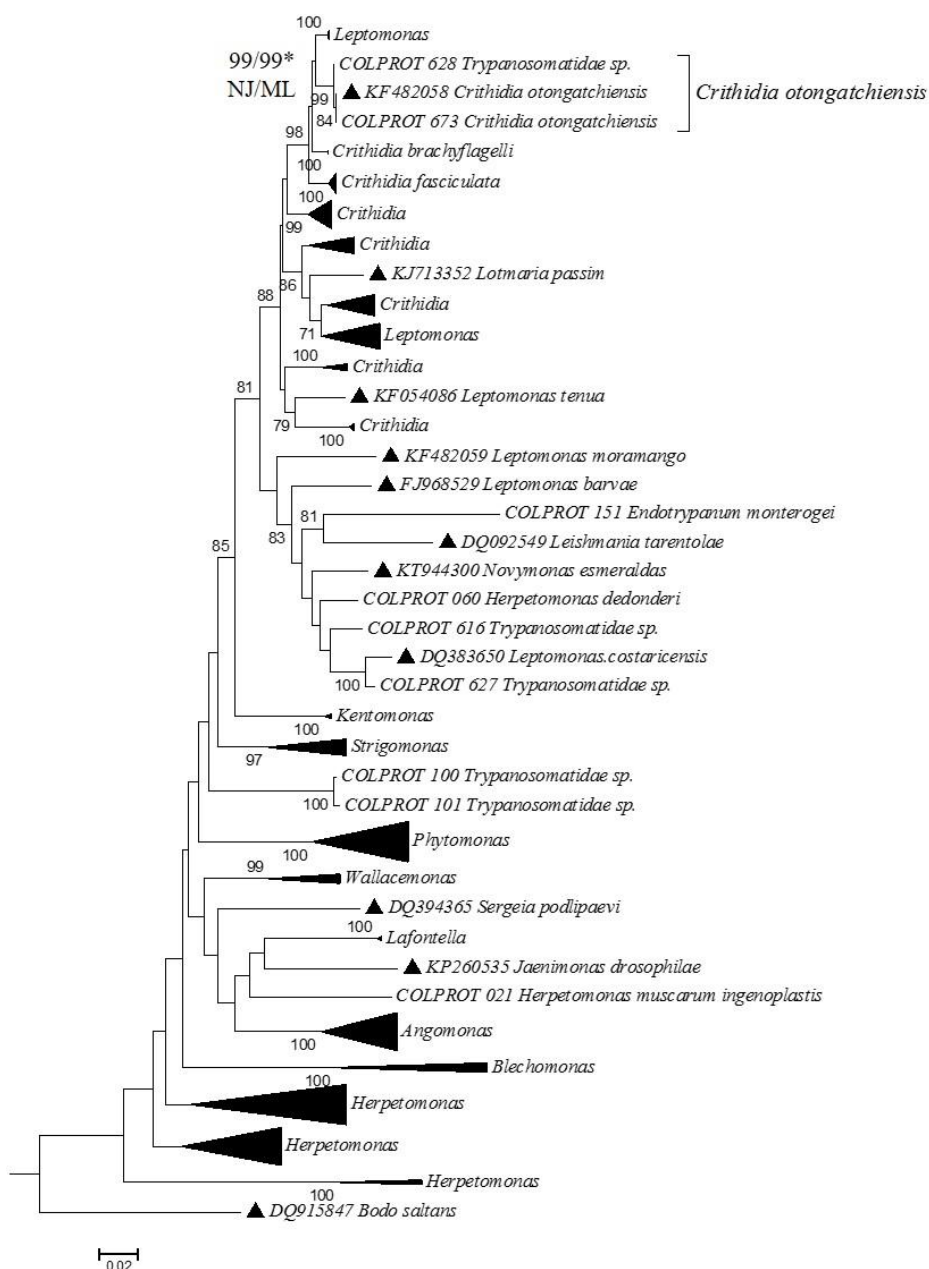


Figura 23- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Crithidia otongatchiensis*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

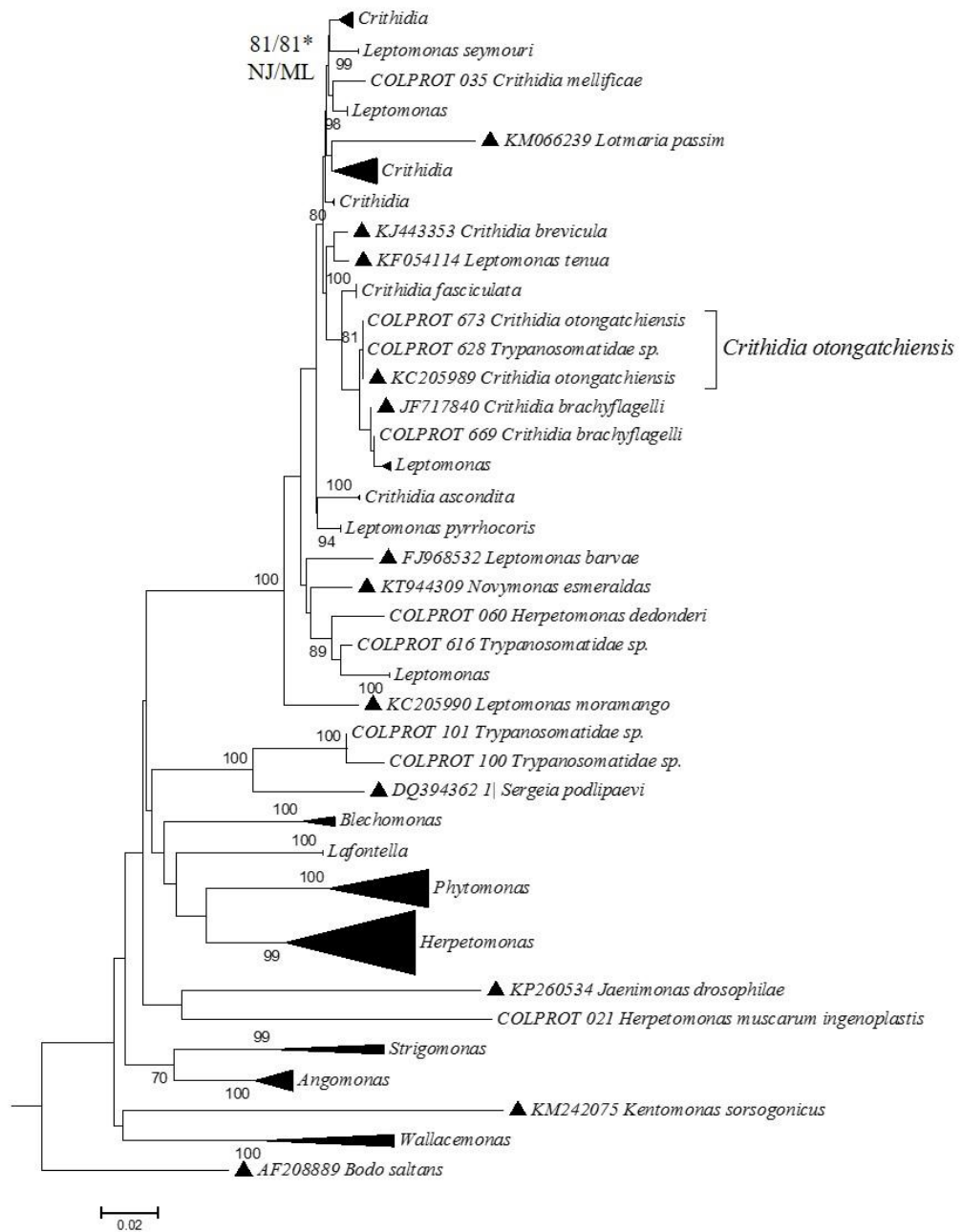


Figura 24- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Crithidia otongatchiensis*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Conseguimos ainda confirmar a identificação taxonômica das seguintes espécies de *Crithidia*, depositadas pelo Dr. Vyacheslav Yurchenko da Universidade de Ostrava (República Checa) (Tabela 10):

Tabela 10- Resultado da confirmação taxonômica de espécies de *Crithidia* depositados na COLPROT. Informações adicionais a respeito de cada depósito encontram-se na tabela 11.

COLPROT	Espécie	% de divergência genética para o alvo gGAPDH	Código do GB para a sequência de referência de gGAPDH	% de divergência genética para o alvo SSUrRNA	Código do GB para a sequência de referência de SSUrRNA
669	<i>Crithidia brachyflagelli</i>	0%	JF717835	0,2%	JF717840
670	<i>Crithidia insperata</i>	0,4%	EU076605	0%	EU079125
671	<i>Crithidia permixta</i>	0,1%	EU076607	0%	EU079127
677	<i>Crithidia abscondita</i>	0%	EU076606	0,2%	EU079126
035	<i>Crithidia mellificae</i>	0,3%	KJ713339	-	-
678, 683 e 684	<i>Crithidia bombi</i>	0-1%	GU321192	0-0,8%	KM980185
679, 685, 686 e 687	<i>Crithidia expoeki</i>	0-0,3%	GU321193	0-0,2%	KM980187

#### 4.4. *Leptomonas*

O gênero *Leptomonas* apresenta os morfotipos promastigota e amastigota (Figura 2). Assim como o gênero *Crithidia*, análises baseadas em marcadores moleculares indicaram a polifilia do grupo (Yurchenko *et al.*, 2008).

As três espécies de *Leptomonas* isoladas de Heteroptera (Hemiptera) na Costa Rica foram classificadas como *Leptomonas bifurcata*, *Leptomonas tarcoles* e *Leptomonas acus* (Yurchenko *et al.*, 2008). Entretanto, as análises do alvo SL publicada pelos autores, mostraram que *L. bifurcata* apresentam sequências muito parecidas com as sequências dos os isolados de *C. luciliae termophila*. A COLPROT não conta com depósito de *L. bifurcata*. Nossas análises foram baseadas nas sequências depositadas no GB dessa espécie (gGAPDH DQ910928/ SSUrRNA DQ910925) e confirmam o observado por Yurchenko, pois *L. bifurcata* apresentou baixa divergência genética e formaram um clado monofilético com este grupo de *Crithidia* (0,01% gGAPDH e 0,02% SSU) (Figuras 8-11, 15 e 16 Anexo I). Nesse sentido, sugerimos que esta espécie seja realocada no gênero *Crithidia*, como um isolado da espécie *C. luciliae termophila*.

No mesmo artigo citado anteriormente (Yurchenko *et al.*, 2008), foi demonstrado também por SL que *L. tarcoles* e *L. acus* tem 80% de identidade entre suas sequências e isso foi confirmado por Jirků (Jirků *et al.*, 2012) que também mostrou pela análise das sequências de gGAPDH e SSU rRNA que as espécies de *L. tarcoles*, *L. acus* e uma nova espécie descrita, *Leptomonas spiculata* apresentam mais de 99% de identidade entre as sequências desses dois marcadores. A COLPROT conta com um depósito de *L. tarcoles* (COLPROT 672), original do artigo, depositada pelo pesquisador Dr. Vyacheslav Yurchenko, da Universidade de Ostrava (República Tcheca). As sequências geradas para este organismo utilizando os marcadores gGAPDH e SSUrRNA foram comparadas com sequências depositadas no GB para gGAPDH (*L. tarcoles* EF546787, *L. acus* DQ910926 e *L. spiculata* JF717833) e SSU (*L. tarcoles* EF546786, *L. acus* DQ910923 e *L. spiculata* JF717838). O resultado da comparação entre as sequências corrobora o resultado encontrado por Jirků e colaboradores (2012): não houve divergência genética na análise das sequências entre o depósito de *L. tarcoles* (COLPROT 672) e as sequências depositadas no Genbank para *L. tarcoles*, *L. acus* e *L. spiculata* e o grupo forma um clado monofilético e por isso sugerimos a sinonímia do grupo em *L. tarcoles* de acordo com ICZN (Figuras 8-11, 25 e 26, Anexo I).



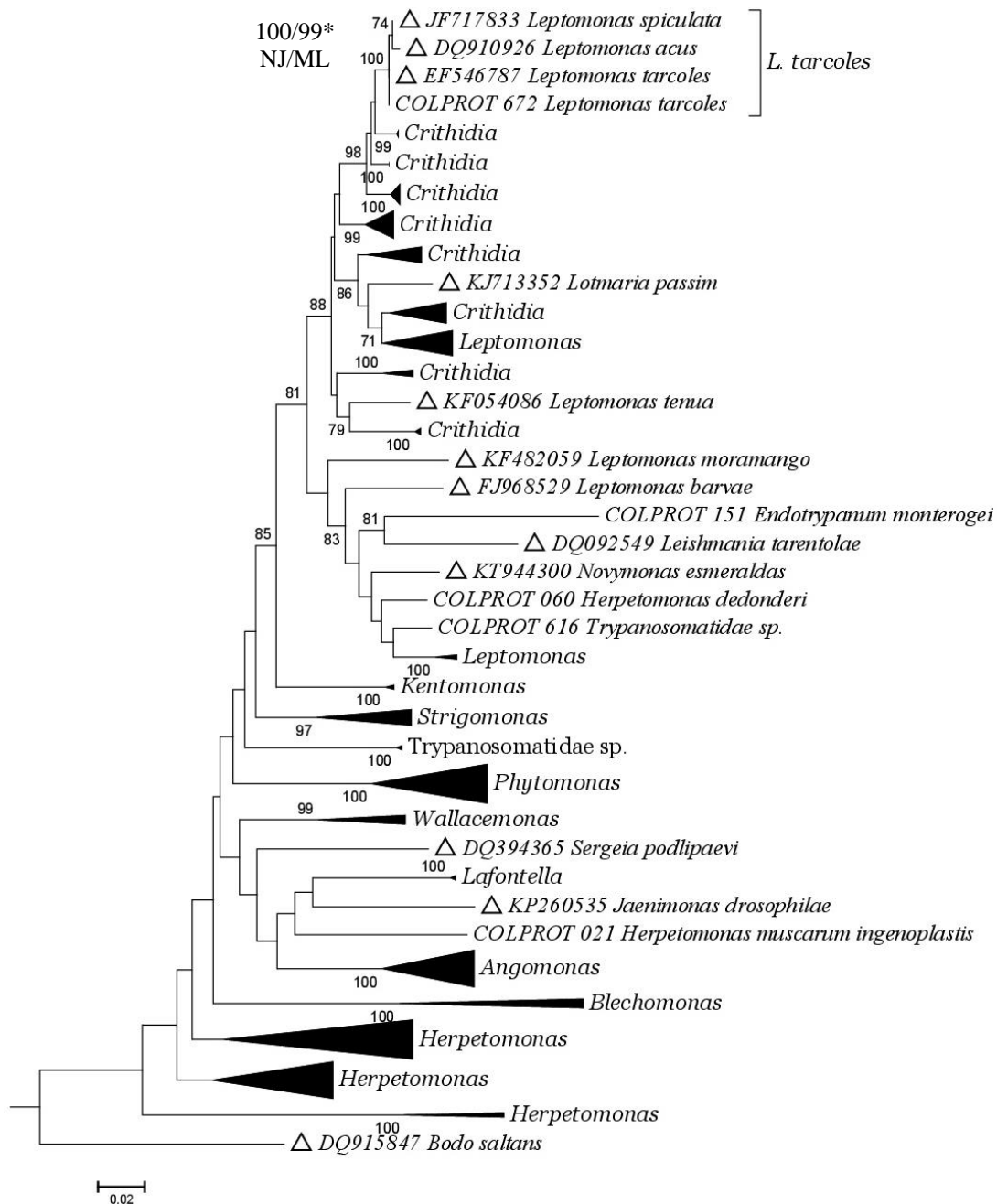


Figura 25- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas tarcoles*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

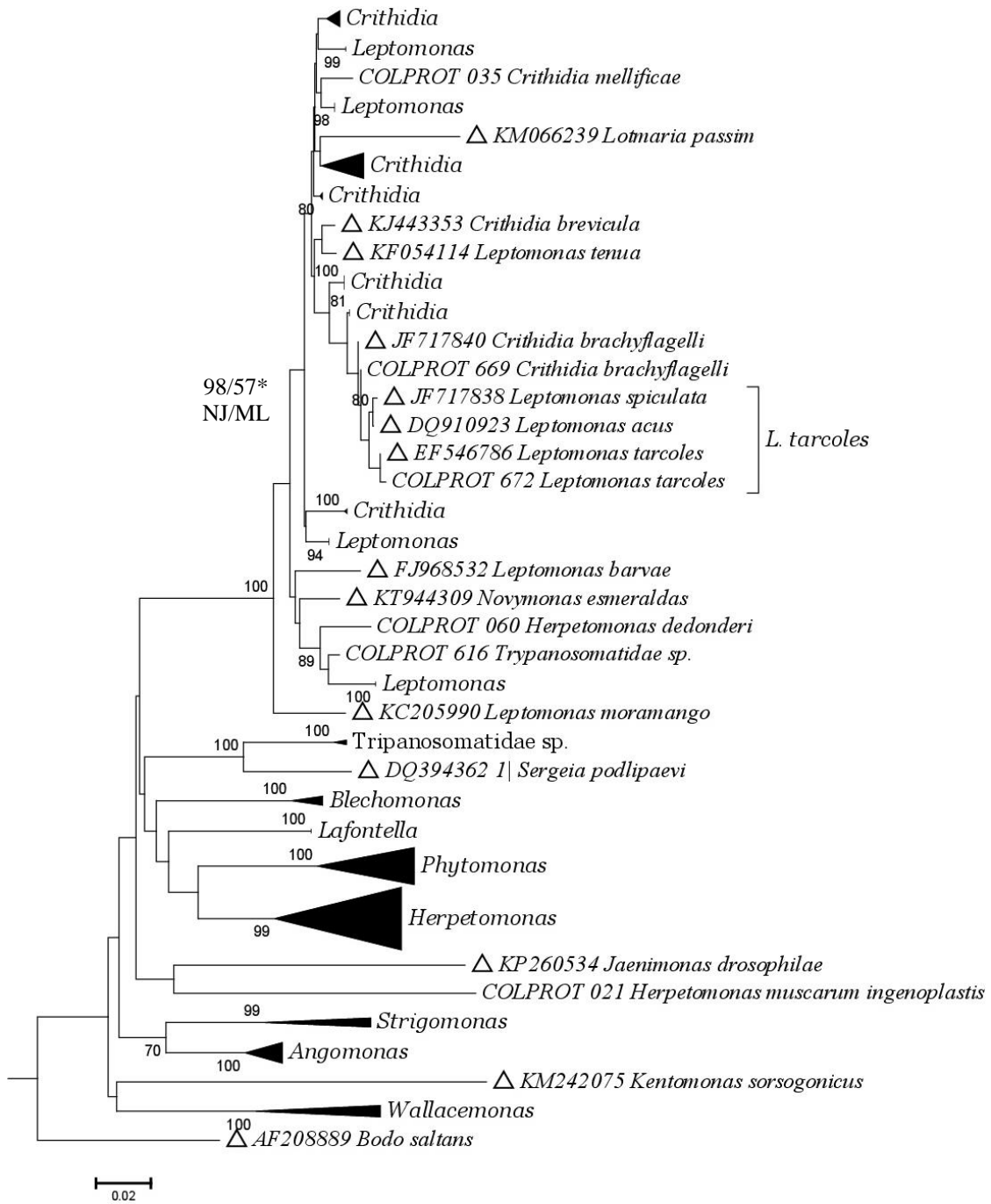


Figura 26- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas tarcoles*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

A identidade taxonômica de *Leptomonas pyrrhocolis* (COLPROT 026) (Zotta G. 1921) foi confirmada através da comparação com sequências desta espécie depositadas no GenBank para os genes gGAPDH (JN036651) e SSUrRNA (JN036653), revelando que não houve divergência genética para ambos os marcadores (Figuras 8-11, 27 e 28, Anexo I). Um depósito ainda não identificado (COLPROT 572), isolado de *Dysdercus* (Hemiptera), não apresentou divergência genética para o marcador gGAPDH com a espécie *L. pyrrhocolis* (Figuras 8, 9 e 27, Anexo I). Um outro depósito sem identificação (COLPROT 706), isolado de *Xanthacrona bipustulata* (Diptera), não apresentou divergência genética para os alvos gGAPDH e SSUrRNA com a espécie de *L. pyrrhocolis*. Sendo assim, as análises indicam que estes isolados são desta espécie (Figuras 8-11, 27 e 28). Todos os isolados descritos acima agrupam em um clado monofilético com a espécie *L. pyrrhocolis*. *L. pyrrhocolis* foi primeiramente isolada na Romênia de um inseto conhecido como *Pyrrhocolis apterus* (Hemiptera), em 1912, e descrita com base apenas na morfologia do isolado (Zotta, 1912). Análises mais recentes da família Pyrrhocoridae mostraram que é possível encontrar *L. pyrrhocolis* parasitando diversas espécies desta família de insetos, em diferentes partes do mundo (Votýpka *et al.*, 2012b). Curiosamente, um dos depósitos de *L. pyrrhocolis* da coleção (COLPROT 706) foi isolado de *Xanthacrona bipustulata* (Diptera), evidenciando o cosmopolitismo da espécie.

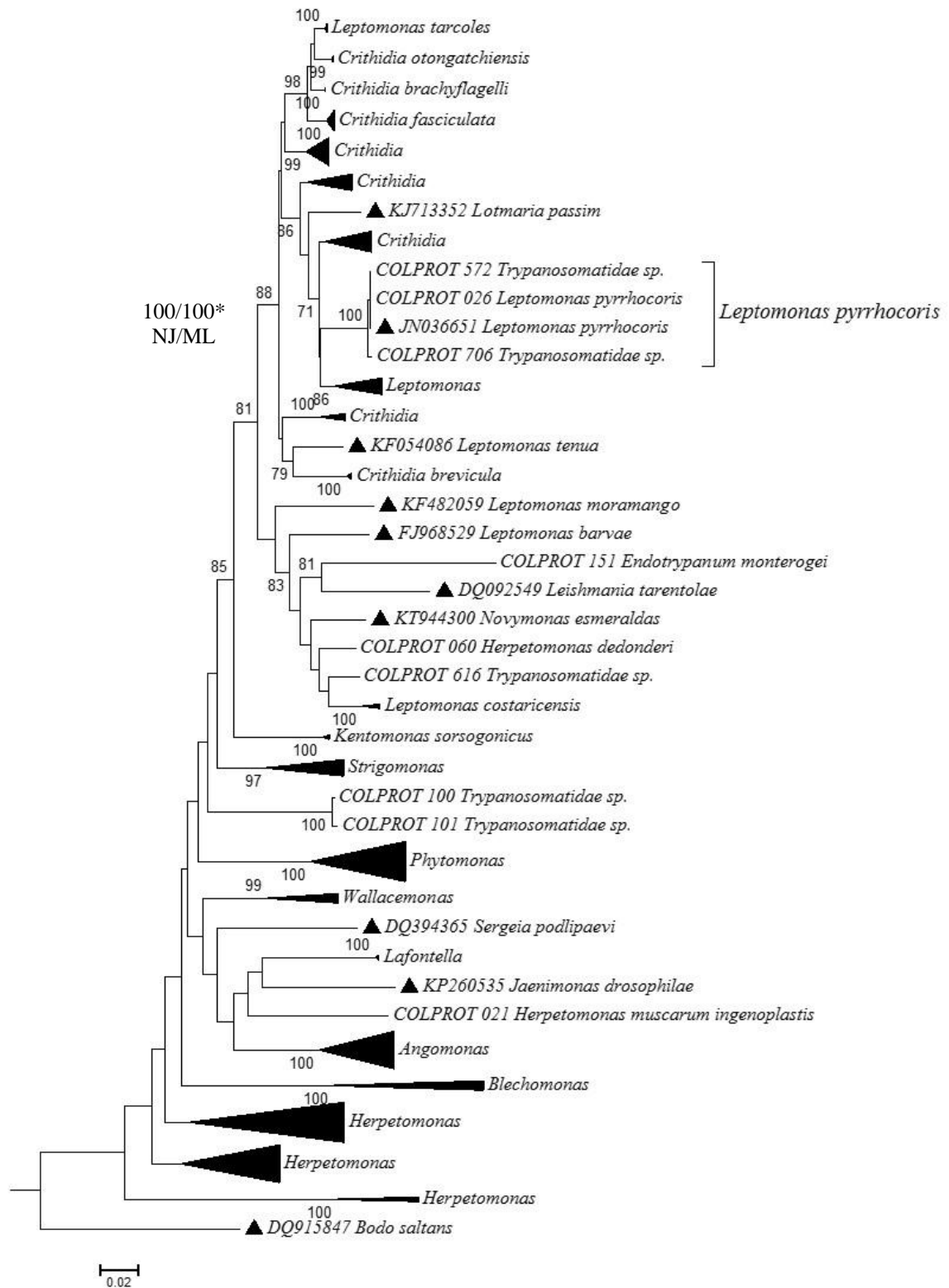


Figura 27- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas pyrhhocoris*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

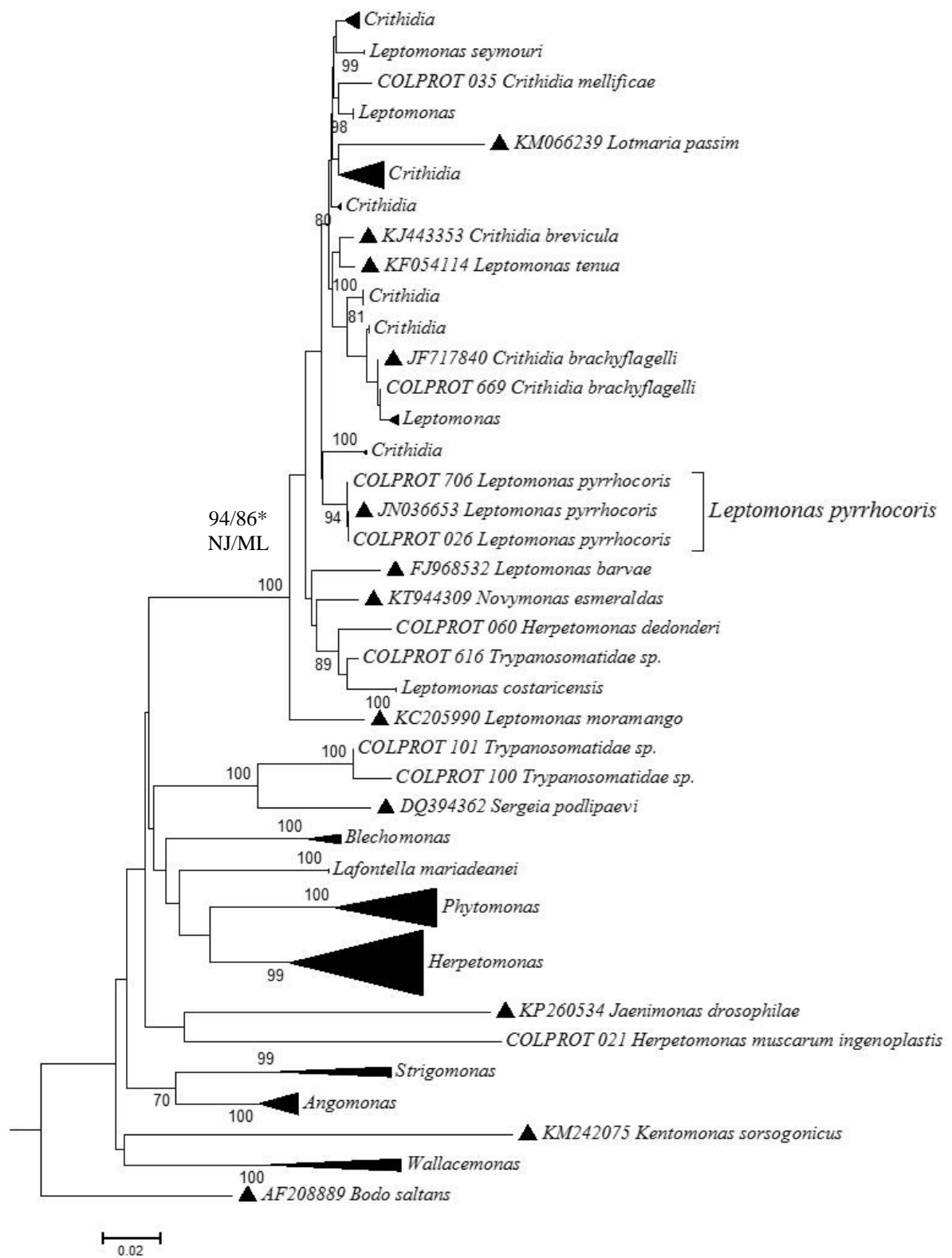


Figura 28- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas pyrhhocoris*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

O depósito de *Leptomonas seymouri* (Wallace, 1977) (COLPROT 277) teve sua identidade taxonômica confirmada através da comparação com a sequência de gGAPDH (KP717896) depositada no GenBank para a mesma espécie. Um depósito não identificado (COLPROT 705) isolado de *Oxysarcodexia* sp. (Diptera) apresenta sequência idêntica à essa espécie sendo possível a identificação taxonômica deste depósito como um isolado de *L. seymouri* pelos marcadores gGAPDH e SSUrRNA (Figuras 8-1, 29 e 30). A espécie *L. seymouri* foi isolada em 1959 no trato digestivo de *Dysdercus suturellus* (Hemiptera) (Wallace, 1977).

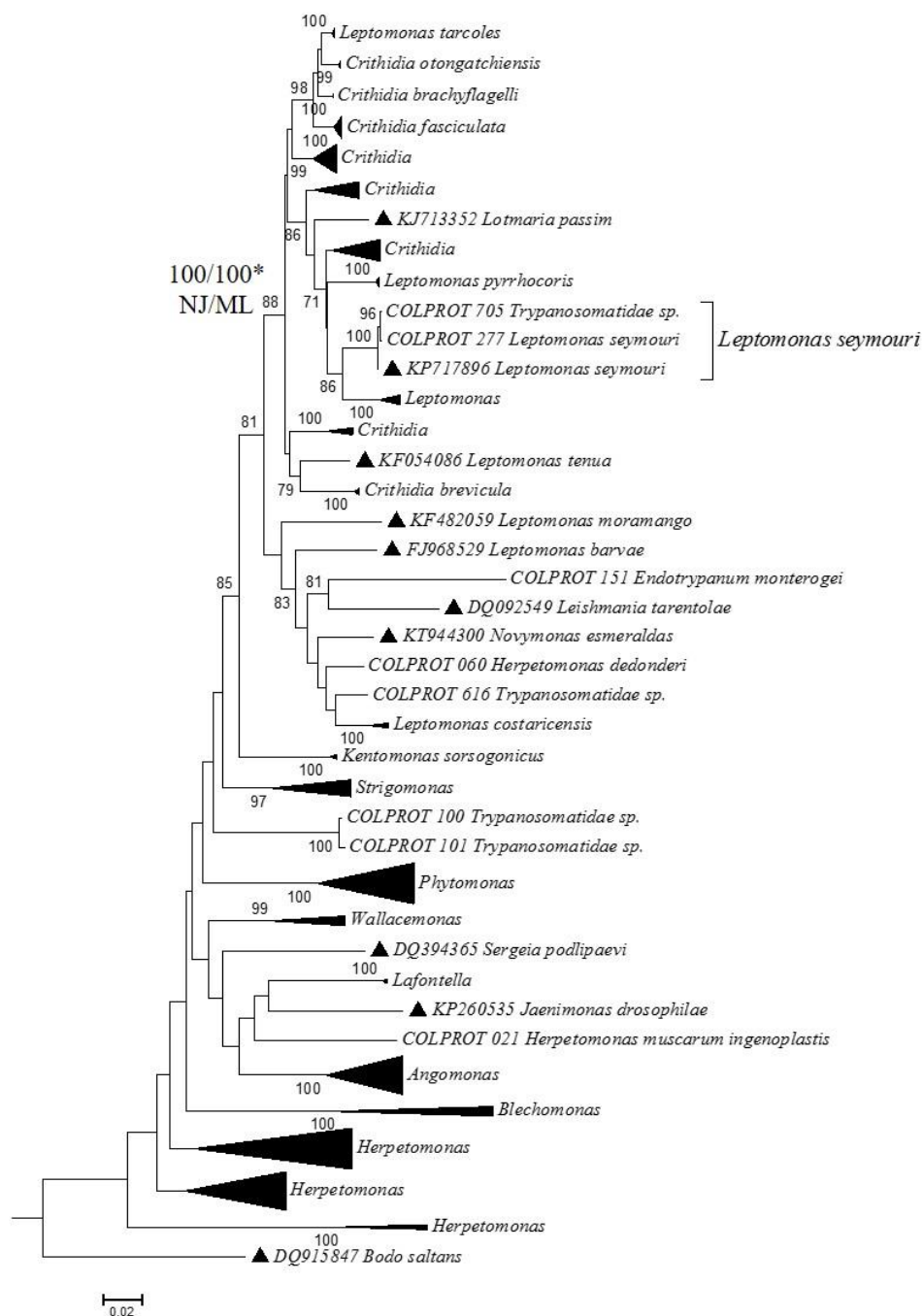


Figura 29- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas seymouri*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

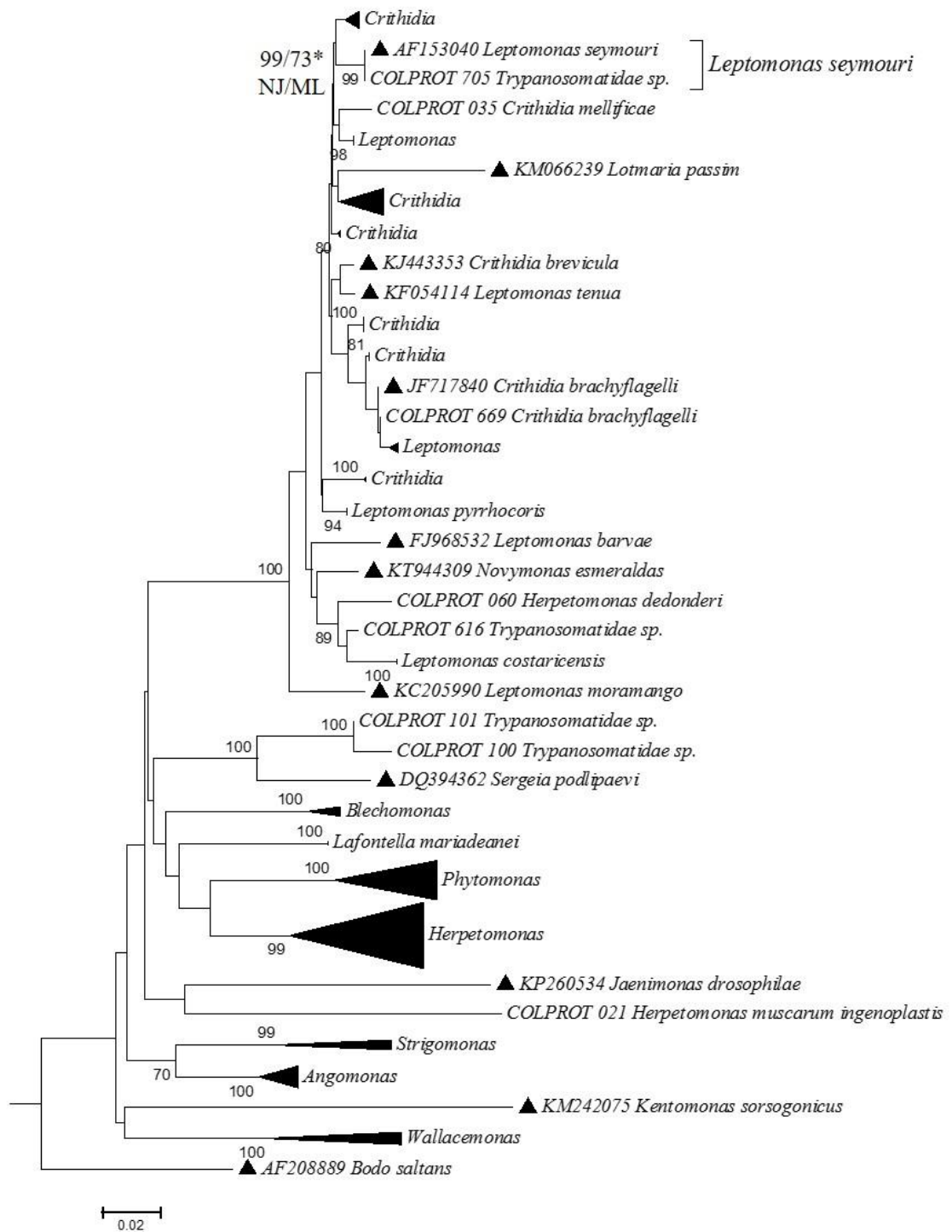


Figura 30- Análise de Neighbor-joining para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas seymouri*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

O depósito COLPROT 344 foi isolado de *Leptocoris trivittatus* (Hemiptera) em 1989 e depositado na coleção em 1999 como uma espécie não identificada do gênero *Leptomonas*. A análise comparativa dos genes gGAPDH e SSUrRNA mostraram que as sequências geradas não apresentam divergência genética e formavam um clado monofilético com as sequências de referência depositadas no Genbank (gGAPDH DQ019001/ SSUrRNA DQ383649) da espécie descrita *Leptomonas podlipaev* para ambos os marcadores (Yurchenko *et al.*, 2006a, 2009) (Figuras 8-11, 31 e 32, Anexo I). Em 2014, a coleção recebeu diretamente do Dr. Vyacheslav Yurchenko uma cepa identificada como *Phytomonas serpens* e depositada como tal (COLPROT 668). Entretanto, em nossas análises identificamos que as sequências geradas para os dois marcadores deste depósito não apresentavam divergência genética e agrupavam em um clado monofilético com as sequências de *L. podlipaev* supracitadas.

A confirmação taxonômica do depósito (COLPROT 674) como *Leptomonas jaderae* se deve ao fato de as sequências geradas de gGAPDH e SSU e aquelas depositadas no GB para os mesmos marcadores (gGAPDH EU076603/ SSUrRNA EU079123) não mostrarem divergência genética e agruparem em um clado monofilético (Figuras 8-11, 31 e 32, Anexo I). O depósito foi feito pelo Dr. Vyacheslav Yurchenko da Universidade de Ostrava (República Tcheca) em 2014. *L. jaderae* foi coletado de *Jadera obscura* (Hemiptera) na Costa Rica em 2009 e identificado como *Leptomonas jaderae* (Yurchenko *et al.*, 2009).

Durante nossas análises, foi possível observar que as espécies *L. podlipaev* (Yurchenko *et al.*, 2006a) e *Leptomonas jaderae* (Yurchenko *et al.*, 2009) não apresentam divergência entre as sequências depositadas no GB para o marcador SSU, ao passo que formam dois cladogramas distintos e monofiléticos quando gGAPDH é analisado, com apenas 2% de divergência genética entre as sequências (Figuras 8-11, 31 e 32, Anexo I). Estas espécies foram descritas com base em observações ao microscópio óptico, ultraestrutura e análise filogenética apenas do gene gGAPDH, enquanto que *L. jaderae* também teve sequenciado os alvos gGAPDH e SL (Yurchenko *et al.*, 2006a; 2009). Os próprios autores que descreveram *L. jaderae* relatam a estrita relação entre essa espécie com a espécie descrita anteriormente, *L. podlipaev* pelas análises realizadas, porém consideraram a análise do gene SL como determinante na descrição da nova espécie. Os autores sugerem ainda que a repetição observada no gene SL RNA seja utilizada como código de barras na determinação de novas espécies de tripanossomatídeos.





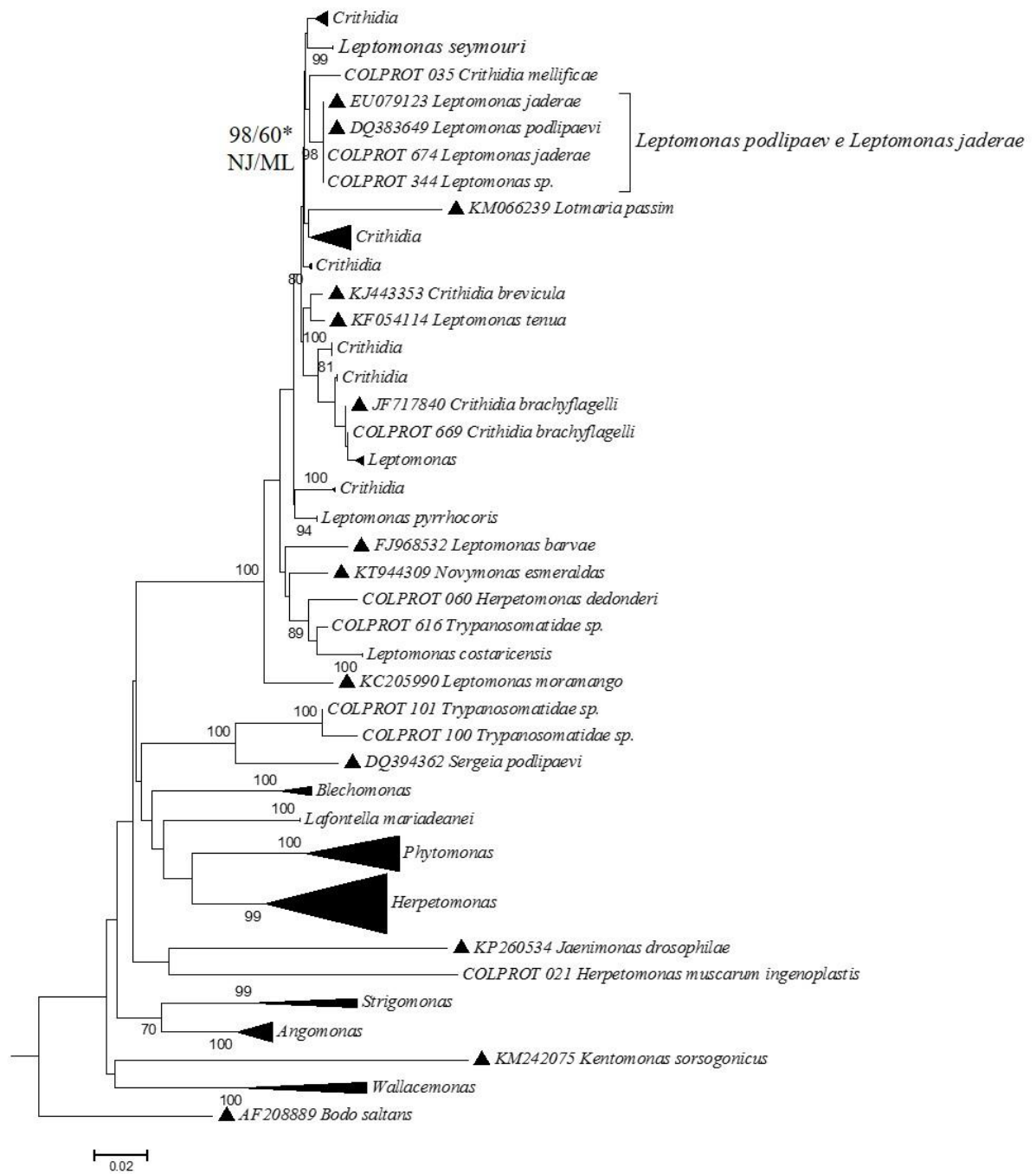


Figura 32- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui as espécies *Leptomonas jaderae* e *Leptomonas podlipaevi*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Em 2013, Borghesan e colaboradores publicaram uma revisão completa do gênero *Herpetomonas*. Nesta revisão, algumas espécies foram realocadas no gênero, como foi o caso de *Leptomonas samueli*. Borghesan e colaboradores (2013) justificam que esta espécie isolada de *Zelus leucogramus* (Hemiptera) e descrita por Carvalho (1973) está mais relacionada ao gênero *Herpetomonas* do que com o gênero descrito primeiramente, *Leptomonas*. Esta justificativa se deu por meio de análises concatenadas dos genes gGAPDH e SSUrRNA. A espécie foi então re-descrita como *Herpetomonas samueli* e as sequências foram depositadas no GB (gGAPDH JQ359742/ SSUrRNA JQ359722). A Coleção de Protozoários da Fiocruz conta com um depósito da espécie de *L. samueli* (COLPROT 074) que será renomeada para *H. samueli*, pois nossos resultados corroboram os encontrados por Borghesan e colaboradores (2013).

Além da re-descrição da espécie *H. samueli*, as análises realizadas por Borghesan e colaboradores (2013) revelaram que as sequências depositadas para *H. samueli* eram quase idênticas com as sequências dos genes gGAPDH e SSUrRNA para uma outra espécie de *Leptomonas*: *Leptomonas lactosovorans* (Manaia *et al.*, 1981). Os autores sugerem que esta espécie seja sinonimizada em *H. samueli*, entretanto eles não dispunham da cultura de *L. lactosovorans* para comprovar o resultado. A COLPROT possui um depósito de *L. lactosovorans* (COLPROT 023) e os resultados obtidos pelo sequenciamento dos genes gGAPDH e COI corroboram aqueles encontrados por Borghesan e colaboradores, mostrando que não há divergência genética entre esses marcadores das espécies além de agruparem como um clado monofilético (Figuras 8, 9, 12, 13, 33 e 34, Anexo I).

Ainda existe uma outra espécie de *Leptomonas* depositada na COLPROT, *Leptomonas wallacei* (COLPROT 194), que agrupou com as espécies analisadas de *H. samueli* e apresenta sequências idênticas para os genes gGAPDH e COI com esta espécie. Nós sugerimos então que as espécies *L. lactosovorans* e *L. wallacei* sejam sinonimizadas para *H. samueli* (Figuras 8, 9, 12, 13, 33 e 34, Anexo I). Vale destacar que não obtivemos sucesso na amplificação do gene SSUrRNA para nenhuma das espécies supracitadas nas condições pré-determinadas.

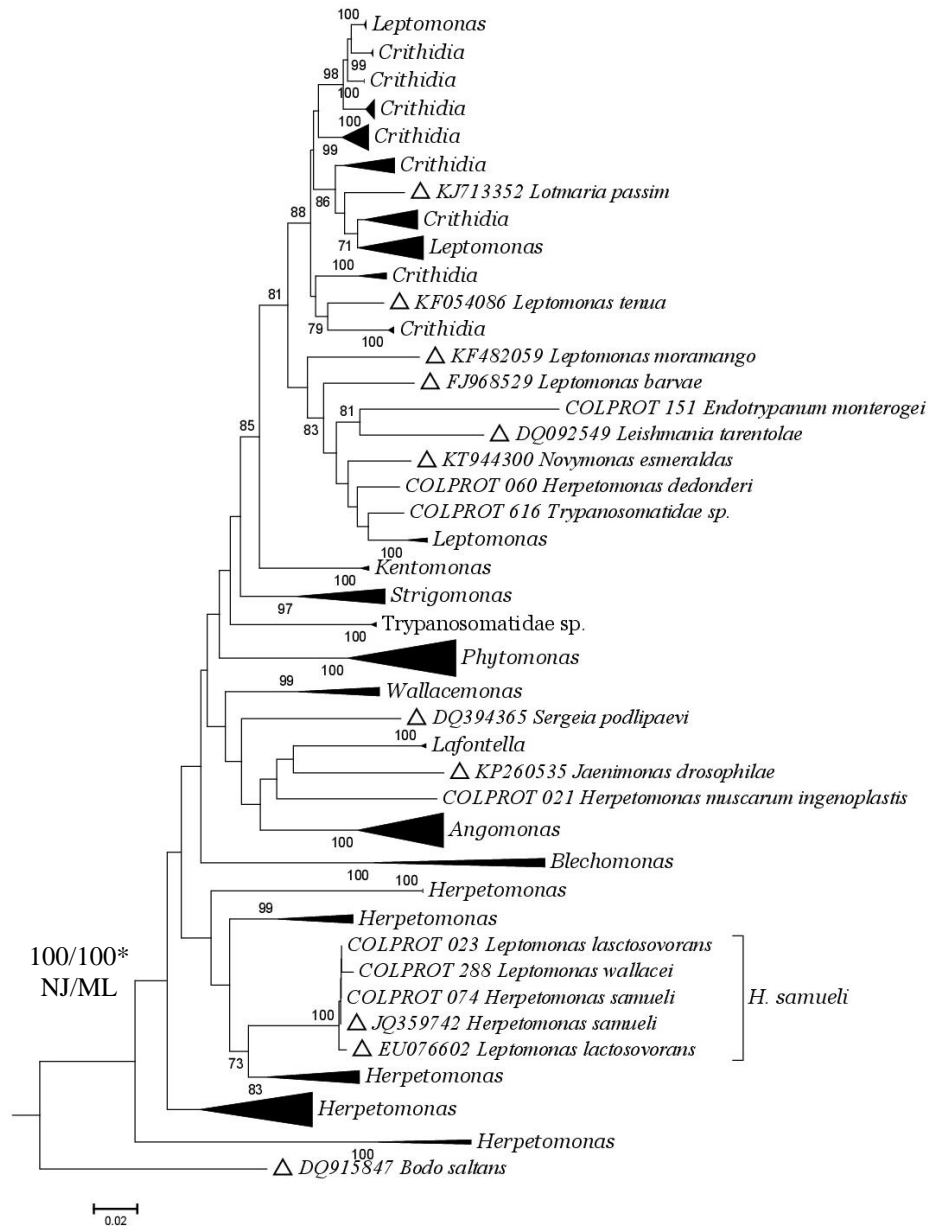


Figura 33- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas samueli*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

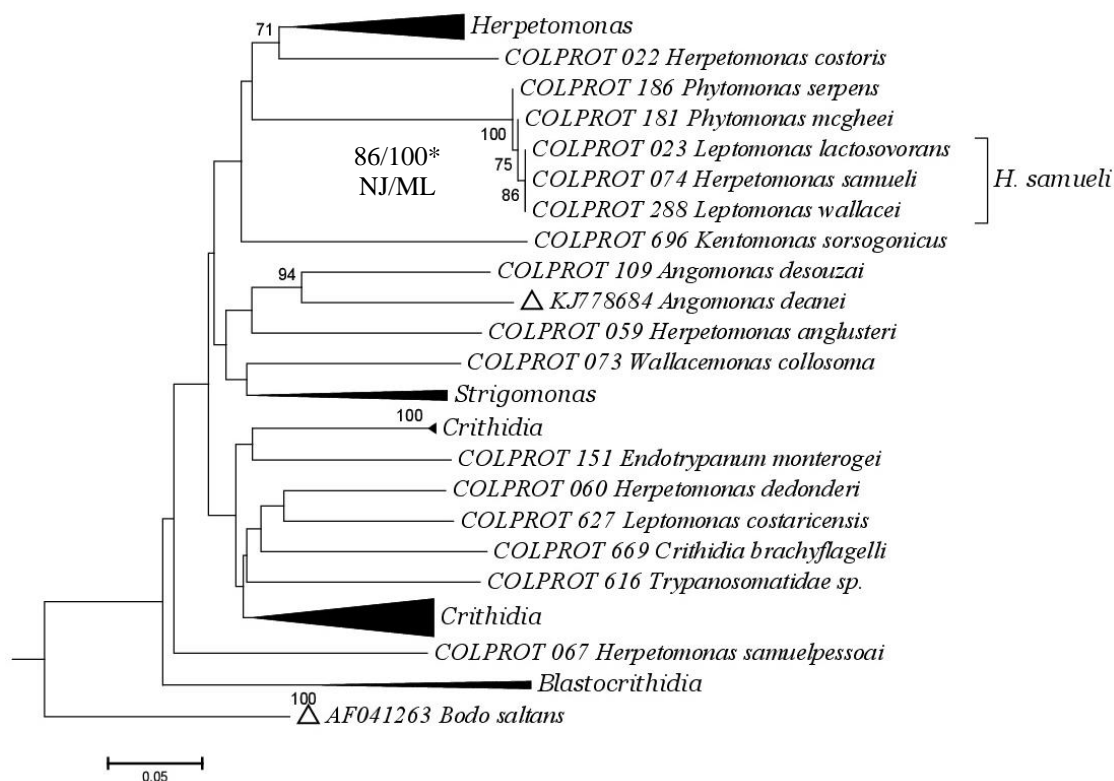


Figura 34- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas samueli*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

A comparação entre sequências de um depósito da Coleção ainda não identificado (COLPROT 627) com as sequências depositadas no *Genbank* para os genes gGAPDH (DQ383650) e SSUrRNA (DQ383648) permitiu a identificação deste depósito como um isolado da espécie *Leptomonas costaricensis*, não havendo nenhuma divergência genética entre as nossas sequências e as de referência (Yurchenko *et al.*, 2006) (Figuras 8-11, 35, 36, Anexo I). Este depósito foi isolado pelo Dr. Denis Blanchet na Guiana em 1994 de um *Ploeogaster* sp. (Hemiptera), depositado na Coleção de Eucariotos Unicelulares (MNHN/Paris) e na COLPROT pelo Dr. Philippe Grellier em 2013 para identificação. A comparação do gene SSUrRNA mostrou também uma alta identidade (98%) com um tripanossomatídeo não identificado depositado no Genbank como G755 (U59491), isolado de um flebotomíneo na Guatemala (Noyes *et al.*, 1997). Este tripanossomatídeo aparece nas análises filogenéticas como um clado entre espécies de tripanossomatídeos monoxênicos e espécies de *Leishmania*. Na descrição de *L. costaricensis*, Yurchenko e colaboradores discutem que esta espécie está filogeneticamente mais relacionada com o isolado de tripanossomatídeo G755 e ambos formam um clado irmão com as espécies de *Leishmania*, que sabidamente são transmitidas por flebotomíneos. Devido a afinidade filogenética observada entre esses organismos com espécies de

*Leishmania*, é provável que *L. costaricensis* e o tripanossomatídeo G755 sejam um grupo ainda desconhecido de parasitas monoxênicos (Yurchenko *et al.*, 2006). Sendo assim, é possível que estudos comparativos entre esses dois organismos possam esclarecer algumas lacunas sobre a evolução e a transição entre o parasitismo monoxênico e heteroxênico.

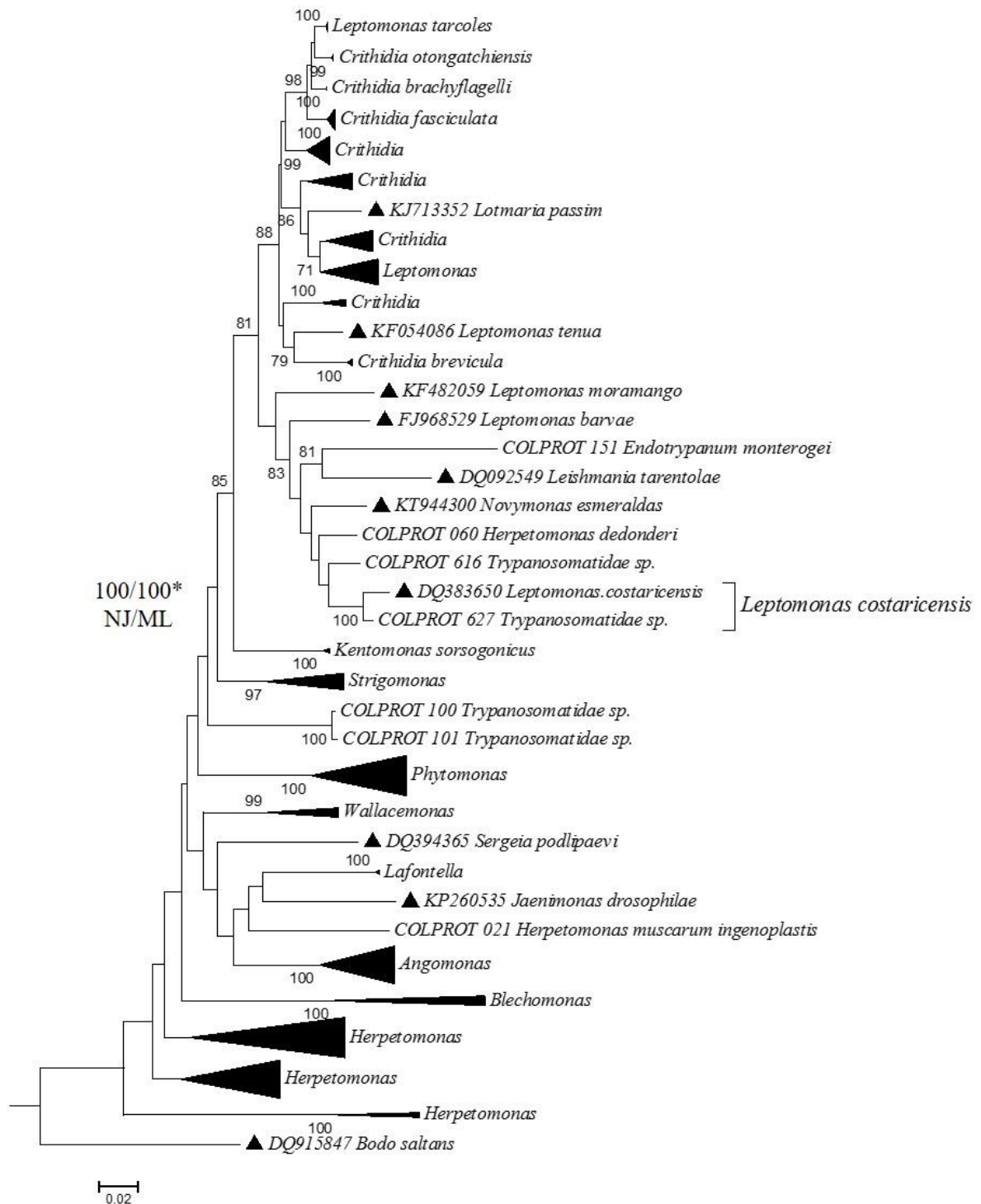


Figura 35- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas costaricensis*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

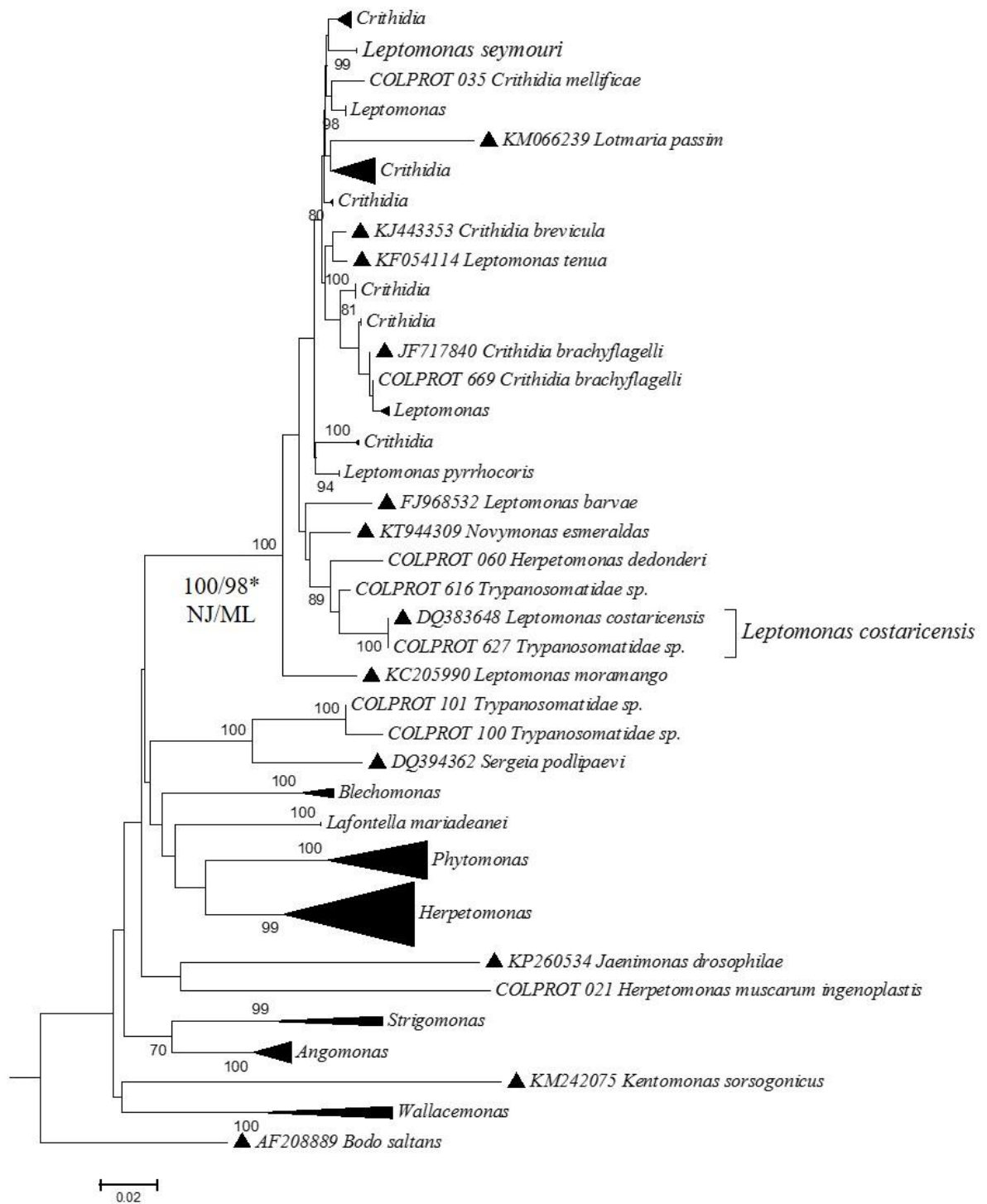


Figura 36- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Leptomonas costaricensis*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

#### 4.5. *Herpetomonas*

O gênero *Herpetomonas* alberga tripanossomatídeos monoxênicos que apresentam formas promastigotas e uma outra forma, exclusiva do grupo, opistomastigotas (Figura 2). Entretanto, essa última forma é raramente vista em insetos e até mesmo em cultura. Por outro lado, as formas promastigotas podem ser observadas em outros gêneros, como *Leptomonas* e *Phytomonas*. Isso gerou ambiguidades na classificação taxonômica do gênero *Herpetomonas*, principalmente na época em que apenas a taxonomia clássica era realizada (Teixeira *et al.*, 1997), e mais recentemente análises filogenéticas demonstraram o polifiletismo do grupo (Teixeira *et al.*, 1997; Borghesan *et al.*, 2013).

*Herpetomonas muscarum* foi descrita como flagelados encontrados em moscas domésticas desde o século XIX. Borghesan (Borghesan *et al.*, 2013) descreve as espécies *Phytomonas davidi* e *Herpetomonas megaseliae* como sinônimas de *H. muscarum* baseada em análises de SSU rRNA e gGAPDH e ITS. Os resultados obtidos neste trabalho através da análise das sequências dos genes gGAPDH, SSUrRNA e COI corroboram os apresentados por Borghesan (2013), pois não há divergência genética entre os organismos quando esses marcadores são analisados e as espécies formam um clado monofilético bem definido. Dessa forma, renomearemos os depósitos COLPROT 076 (*P. davidi*) e COLPROT 033 (*H. megaseliae*) em *H. muscarum* (Figuras 8-13, 37-39, Anexo I). Também pudemos identificar que um isolado depositado como *Phytomonas serpens* (COLPROT 229) não correspondia a espécie de depósito, e sim a isolados de *H. muscarum* pela análise dos três marcadores (Figuras 8-13, 37-39, Anexo I). Já havia suspeita de classificação errônea por parte de seu depositante. O espécime foi isolado de *Solanum lycopersicum* (Solanales) em 1986, identificado e depositado pelo Dr. Fiorini em 1996. Os métodos da época levaram a descrição desta espécie como *Phytomonas serpens*, por possuir a forma promastigota e ter sido isolado de tomate.

O depósito COLPROT 081 foi identificado como uma espécie não identificada de *Phytomonas*. O espécime foi isolado de erva-andorinha [*Euphorbia hyssopifolia* (Malpighiales)] e depositado na Coleção pela Dra. Marcia Attias. Através da análise das sequências dos marcadores gGAPDH, SSUrRNA e COI, ficou evidente que esse depósito se trata de um isolado de *H. muscarum*, pois não há divergência genética entre esse isolado e a sequência referência da espécie além de formarem um clado monofilético (Figuras 8-13, 37-39, Anexo I).



Os depósitos sem identificação prévia, COLPROT 013 e COLPROT 185 foram identificados como novos isolados de *H. muscarum* a partir da análise das sequências dos alvos gGAPDH, SSUrRNA e COI, que não apresentaram divergência genética com este clado (Figuras 8-13, 37-39, Anexo I). O depósito COLPROT 013 foi coletado pelo pesquisador Dr. Reginaldo Brazil e isolado da glândula salivar de *Phthia picta* (hemíptera), hospedeiro frequentemente encontrado parasitado por este gênero de tripanossomatídeo. O depósito COLPROT 185 foi isolado pelo mesmo pesquisador, a partir de uma lesão de um roedor, *Nectomys squamypes* (Rodentia). A identificação deste último depósito como espécie do gênero *Herpetomonas* nos permite reforçar a discussão sobre os crescentes relatos de tripanossomatídeos, normalmente não infectivos, podendo explorar novos nichos ecológicos em vertebrados (revisto por Chicharro & Alvar, 2003).

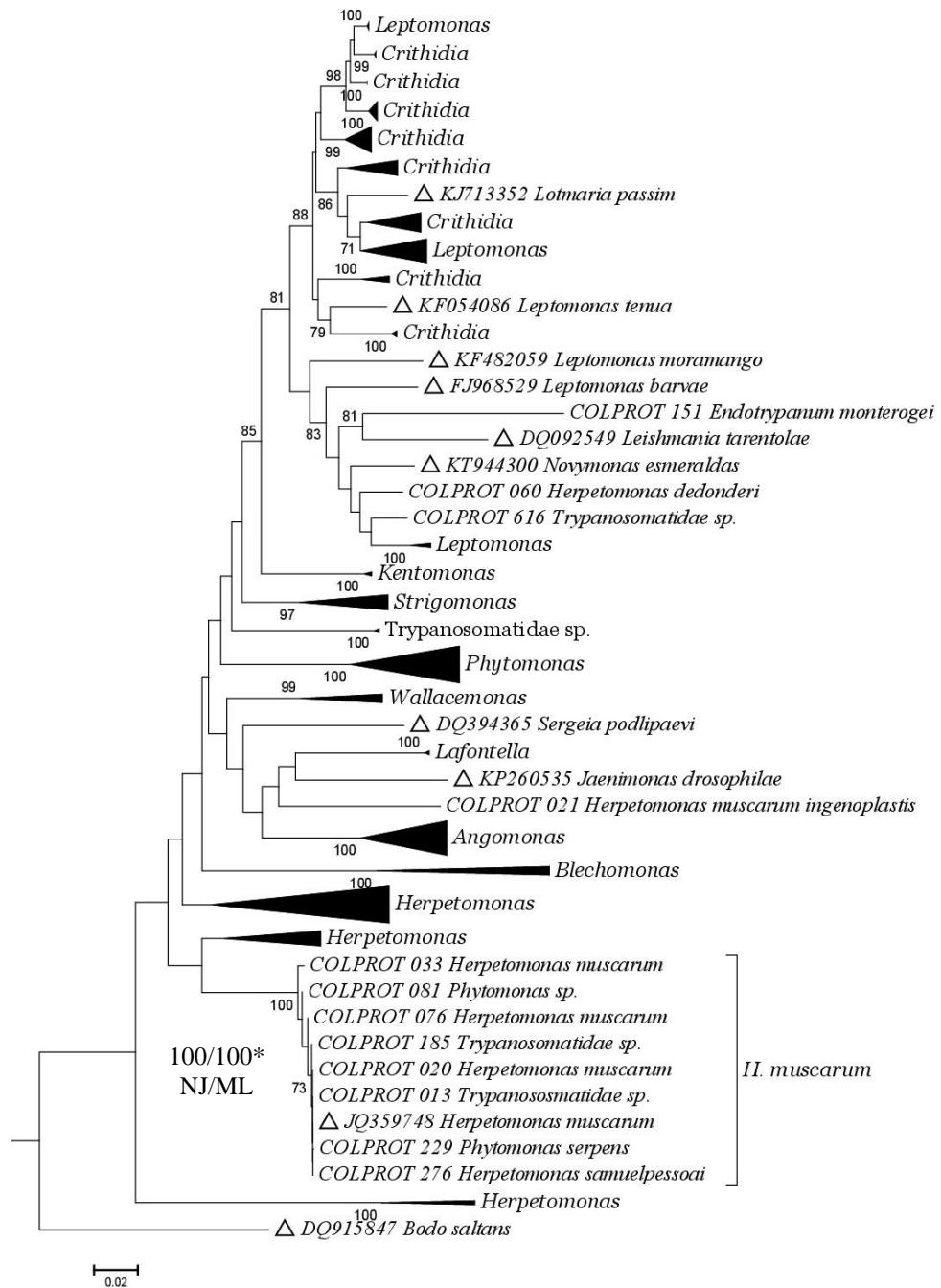


Figura 37- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas muscarum*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

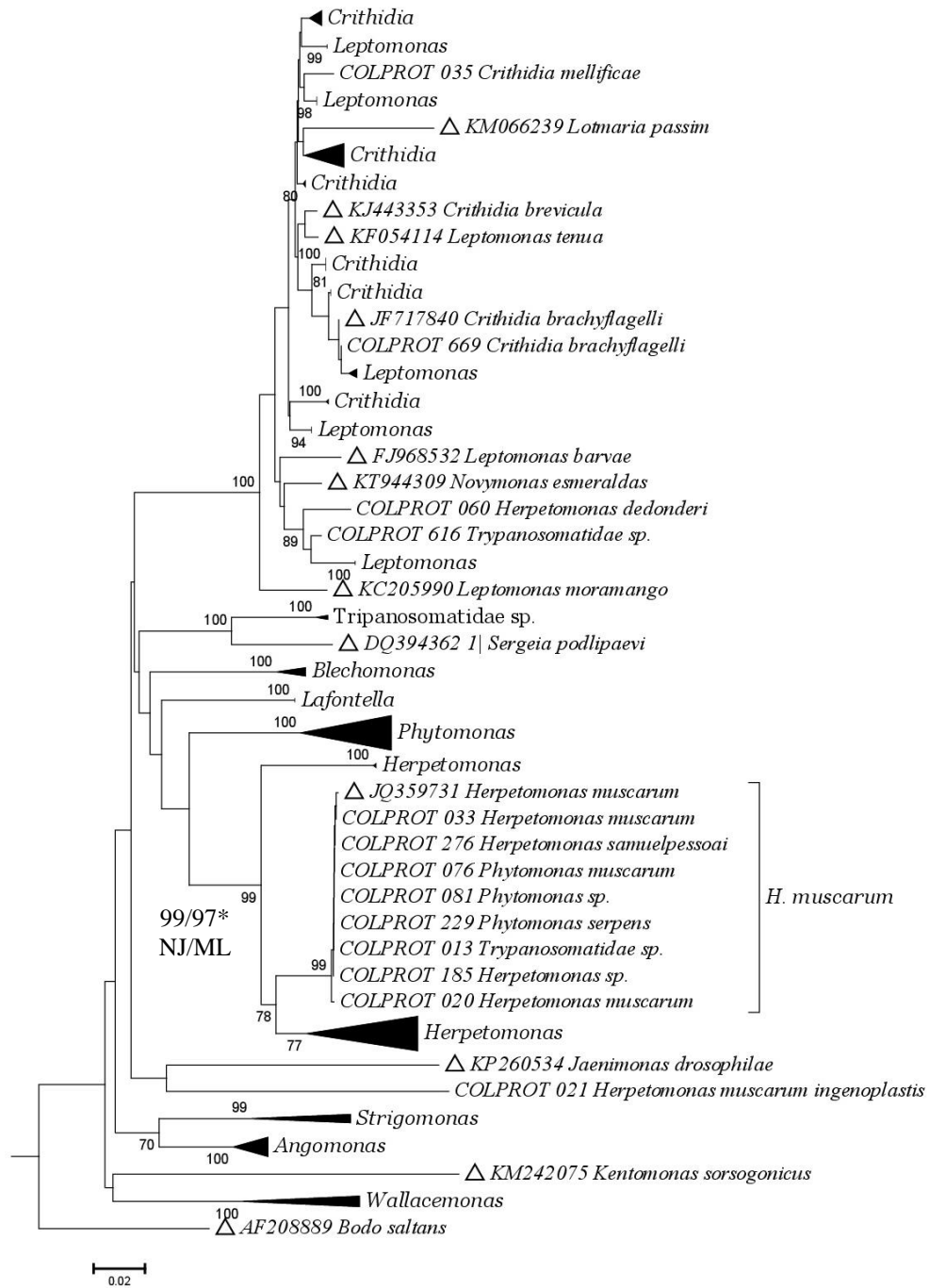


Figura 38- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas muscarum*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

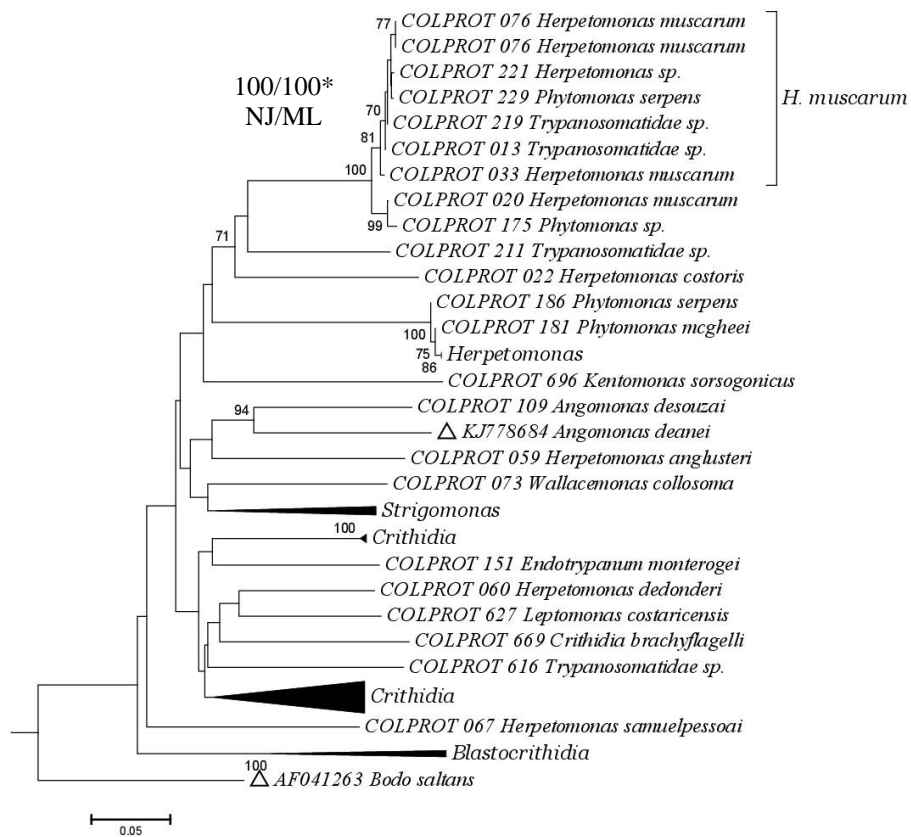


Figura 39- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas muscarum*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

A espécie *Herpetomonas anglusteri* foi isolada e descrita por Fiorini e colaboradores (1989). A espécie foi coletada do intestino de *Liopygia ruficornis* (Diptera), em Alfenas (MG) em 1986. Em 1997, Teixeira e colaboradores relataram esta espécie como mais relacionada a espécie de *C. fasciculata* do que ao gênero *Herpetomonas*, pela análise de marcador ribossomal. Entretanto, nossos resultados mostraram pela análise dos genes gGAPDH e SSUrRNA que *H. anglusteri* não apresenta divergência genética com a espécie *Herpetomonas samuelpessoai* (Figuras 8-11, 40 e 41, Anexo I). Não existe sequência de DNA de *H. anglusteri* disponível em banco de dados públicos, porém vale destacar que *H. samuelpessoai* apresenta 85% de similaridade na análise dos genes gGAPDH e SSU com a espécie *C. fasciculata*, indicando que *H. anglusteri* está mais relacionada ao gênero *Herpetomonas* do que ao gênero *Crithidia*, formando um clado monofilético. Os espécimes COLPROT 223 e 227, isolados de Diptera e depositados na coleção ainda sem caracterização, apresentam sequências idênticas as de *H. samuelpessoai* para os marcadores analisados (gGAPDH e SSU) (Figuras 8-11, 40 e 41, Anexo I).

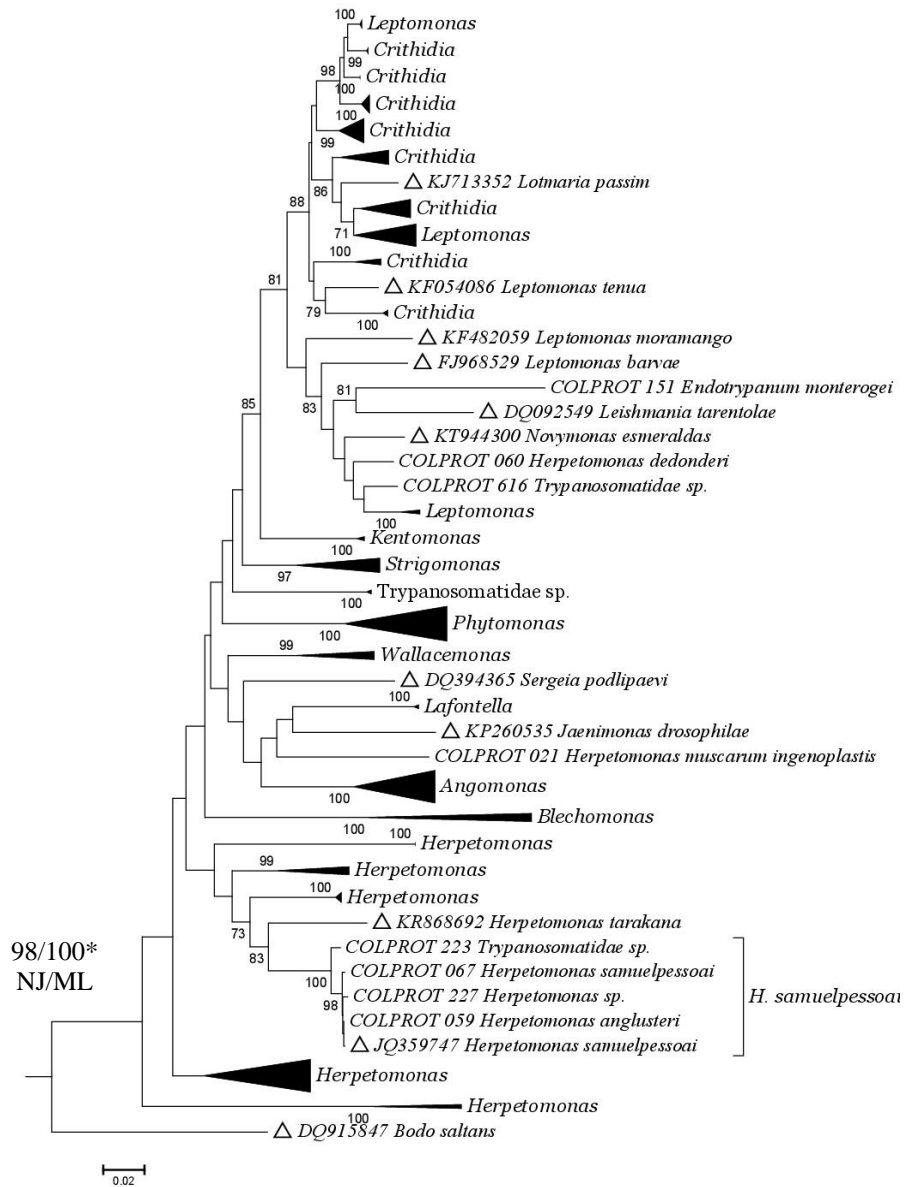


Figura 40- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas samuelpessoai*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

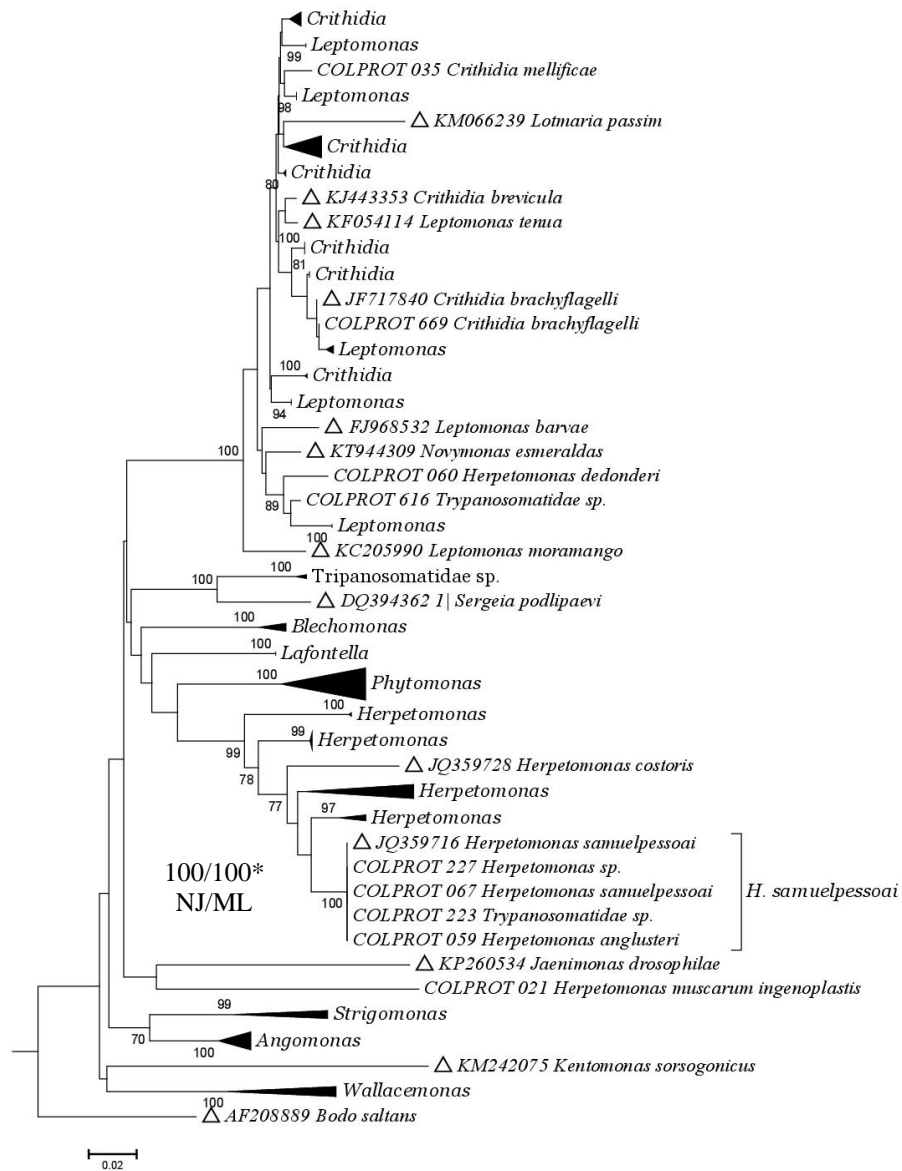


Figura 41- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas samuelpeessoai*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Um outro clado monofilético observado na análise de gGAPDH e SSU compreende três depósitos sem divergência genética entre as sequências com a espécie *Herpetomonas isaaci*, descrita por Borghesan e colaboradores (2013) (Figuras 8-11, 42 e 43, Anexo I). Estes depósitos compreendem isolados de *Chrysomya megacephala* (Diptera) coletados pela Dra. Karina Alessandra Morelli e por mim no campus da Fiocruz-Manguinhos (COLPROT 710 e 711), um flagelado coletado de fezes de suíno (*Sus domesticus*) (COLPROT 682) de criação doméstica no município de São Gonçalo, Rio de Janeiro. Estes dados mostram a ampla distribuição geográfica e ocorrência desta espécie, que até então, contava apenas com a descrição da espécie tipo.

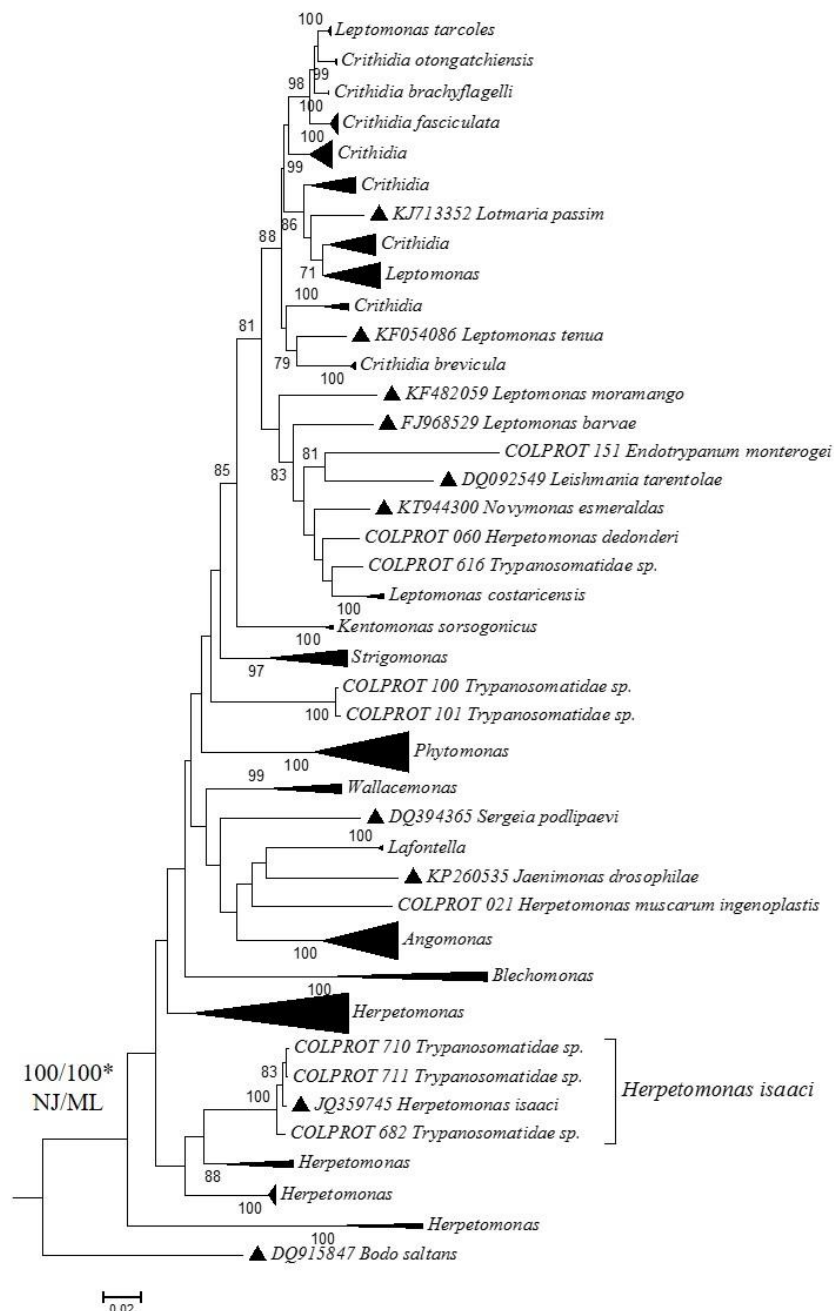


Figura 42- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas isaaci*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.



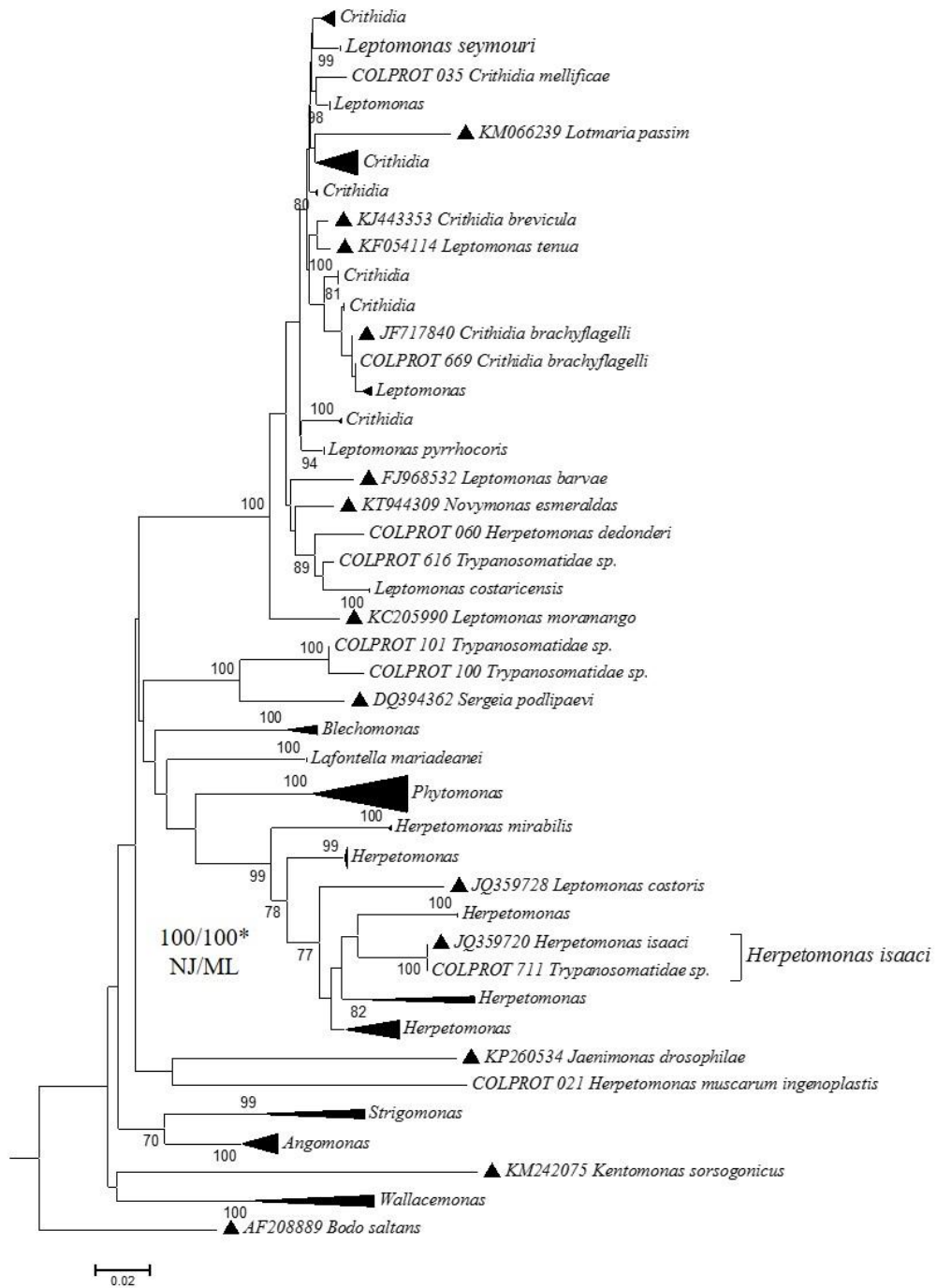


Figura 43- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas isaaci*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Ainda, foi possível identificar o depósito COLPROT 211 que não apresentava identificação prévia, como um isolado da espécie *Herpetomonas elegans* (Borghesan *et al.*, 2013) pelas análises do gene gGAPDH (JQ359735) e SSU (JQ359725), por não apresentarem divergências genéticas quando comparadas com a sequência referência da espécie e agruparem em um clado monofilético (Figuras 8-11, 44 e 45, Anexo I). Este depósito foi isolado de Sifídeo (Diptera) pela Dra. Mariangela Ziccardi no campus da Fiocruz/ Rio de Janeiro. *H. elegans* foi descrito por Borghesan e colaboradores (2013) isolado de *Ornidia obesa* (Diptera) em Rondônia (Brasil). Seu *status* de nova espécie foi baseado na análise morfológica em conjunto com análises de sequências genômicas.

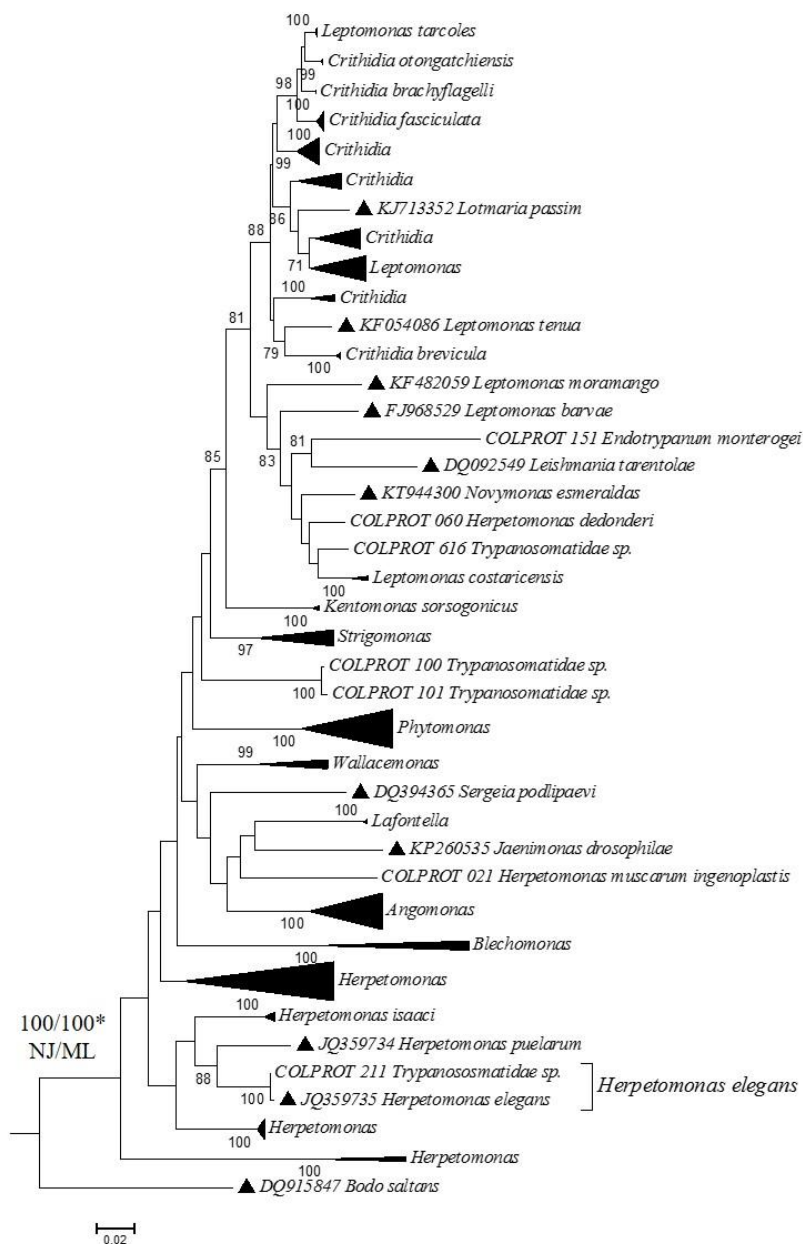


Figura 44- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas elegans*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

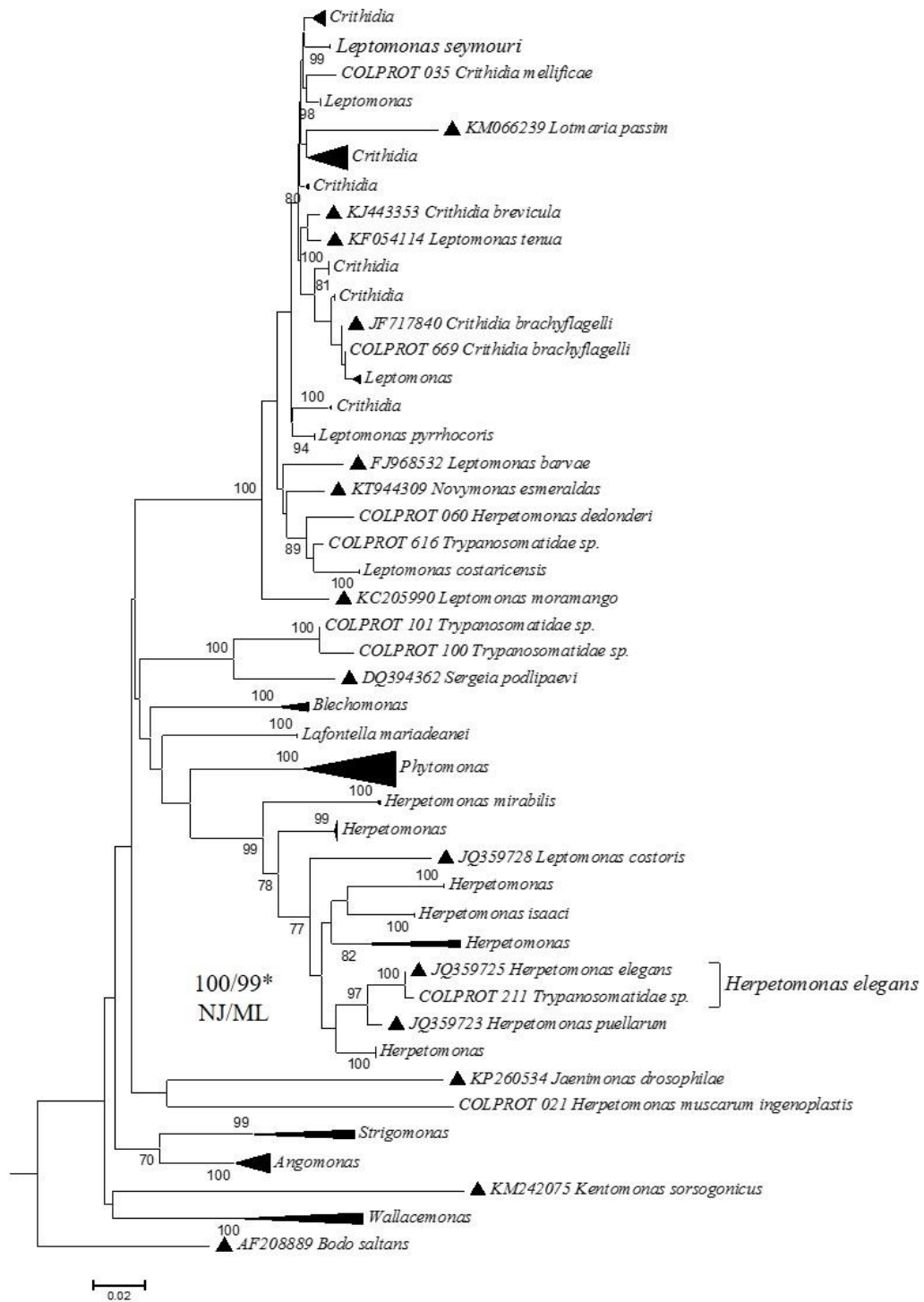


Figura 45- Análise de Neighbor-joining para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas elegans*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

O isolado COLPROT 707 depositado em 2015 pelo Dr. Jan Voltypka, da Charles University na República Tcheca foi isolado de *Cyrtoneurospis conspira* (Diptera) na região de Angra dos Reis, no Rio de Janeiro. A análise dos genes gGAPDH e SSU não apresentou divergência genética com duas sequências do GB (gGAPDH JQ359736/ SSU JQ359726) e com isso permitiram a identificação do isolado como *Herpetomonas modestus* (Borghesan *et al.*, 2013) (Figuras 8-11, 46 e 47, Anexo I). *H. modestus* foi descrita com base em análises morfológicas e moleculares por Borghesan e colaboradores (2013), tendo sido isolada de *Chrysomya megacephala* (Diptera) proveniente do Mato Grosso do Sul (Brasil).

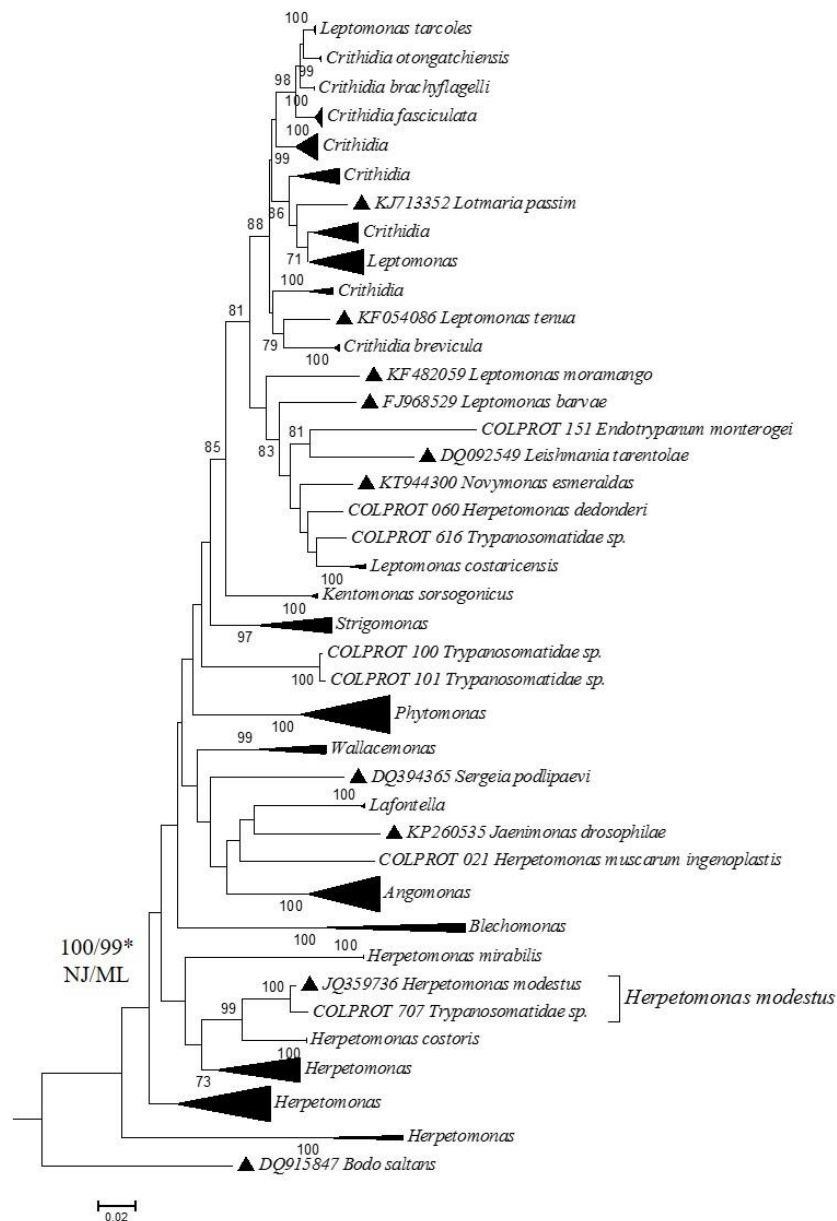


Figura 46- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas modestus*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

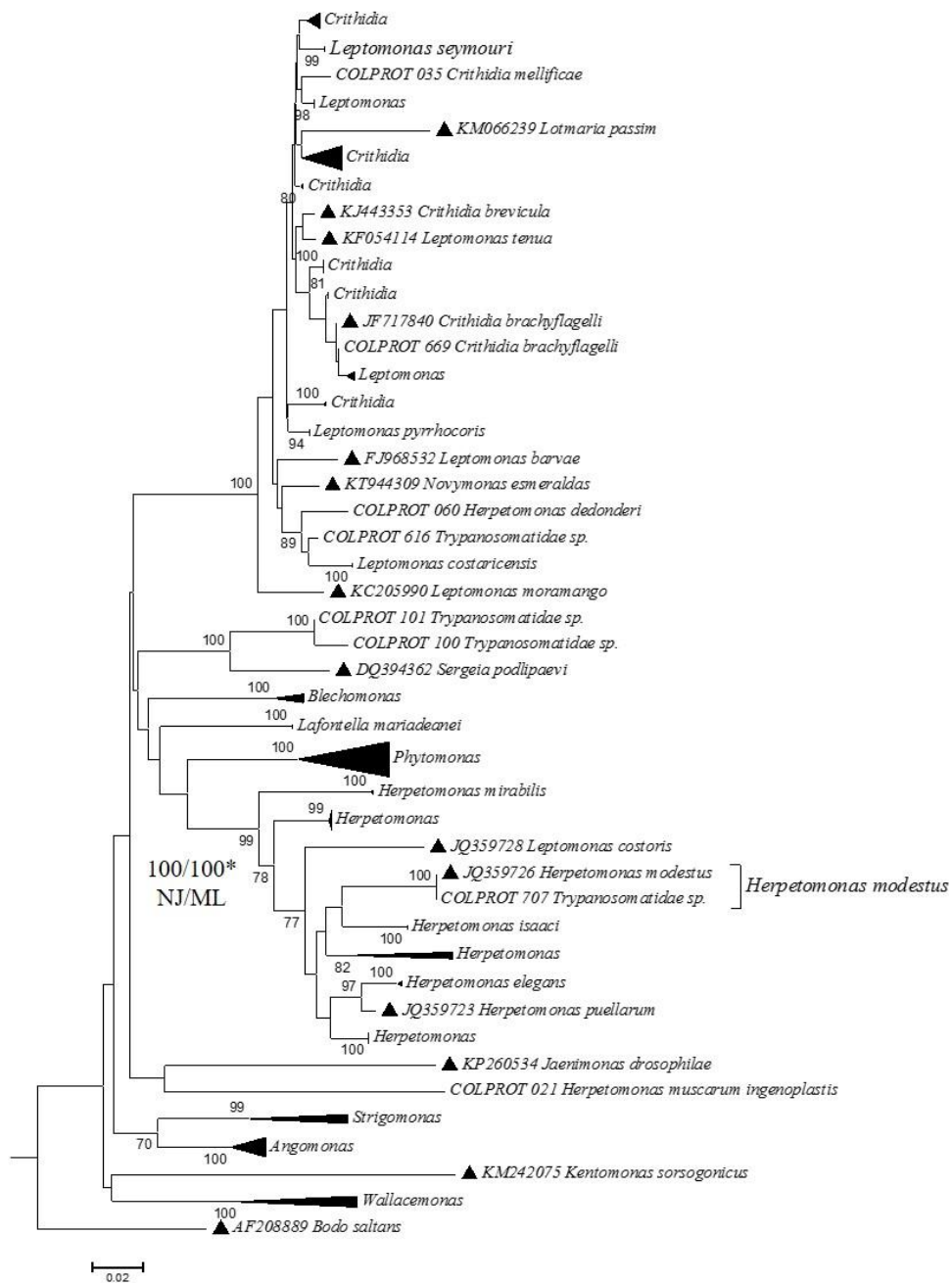


Figura 47- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas modestus*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

A espécie *Herpetomonas mirabilis* foi primeiramente descrita por Roubard (1908), isolada de moscas varejeiras do Congo. Em 1926, Wenyon relatou tripanossomatídeos em moscas varejeiras da Índia, Itália e do Sudão e descreveu como uma nova espécie de *Herpetomonas*. Entretanto, Wallace & Todd (1964) observaram flagelados extremamente grandes em moscas varejeiras da Guatemala, nomeando-os como *Leptomonas mirabilis*. O trabalho de Borghesan e colaboradores (2013) demonstrou que este flagelado é na verdade uma espécie de *Herpetomonas*. Dando prioridade a designação proposta por Wenyon (1926), a espécie ficou validada como *H. mirabilis*. A COLPROT conta com um depósito (024) obtido diretamente da ATCC em 1995 de *L. mirabilis* que, segundo informações obtidas na época, foi isolada de *Cynomya cadaverina* (Diptera) na Guatemala pelo Dr. Wallace em 1963 (Wallace *et al.*, 1964). Análises dos genes gGAPDH e SSU corroboram os resultados descritos por Borghesan e o depósito de *L. mirabilis* (COLPROT 024) será renomeado para *H. mirabilis* (Figuras 8-11, 48 e 49, Anexo I).

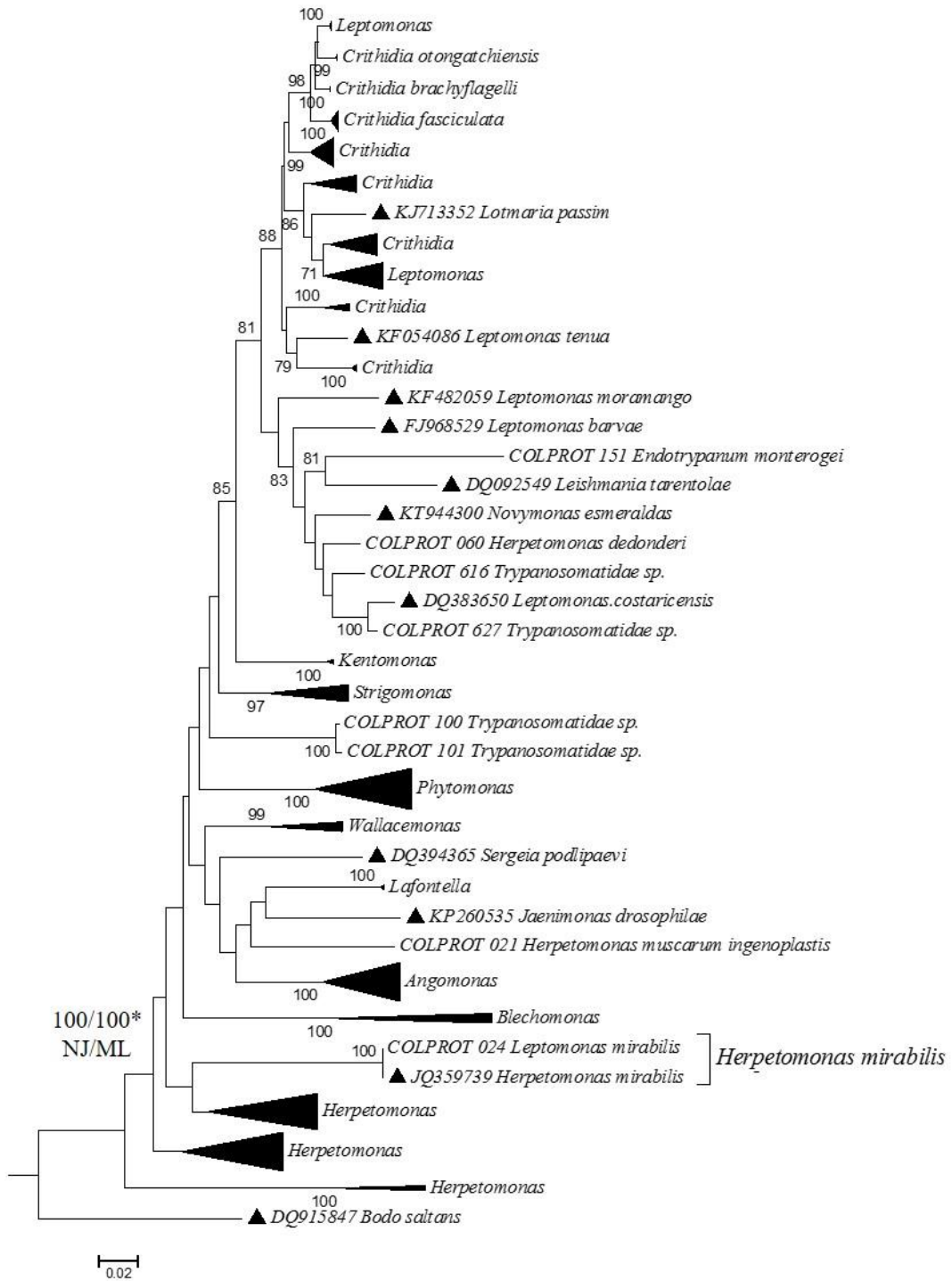


Figura 48- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas mirabilis*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

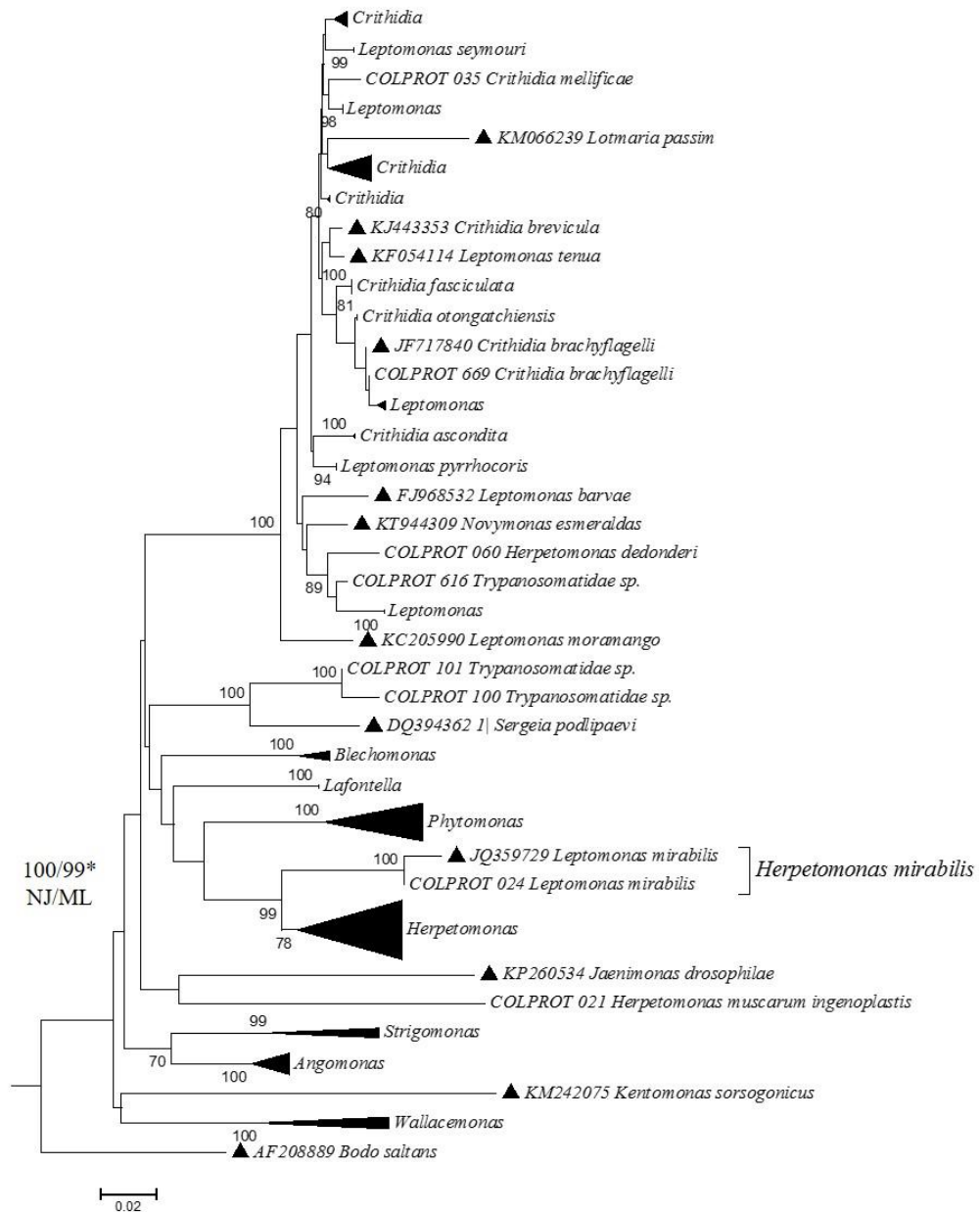


Figura 49- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas mirabilis*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.



Uma situação parecida aconteceu com a espécie *Leptomonas costoris*. A espécie foi primeiramente descrita como pertencente ao gênero *Leptomonas* por Wallace (1965) isolada de *Gerris comatus* (Hemiptera) proveniente dos Estados Unidos. A COLPROT obteve uma amostra oriunda da ATCC em 1994 (COLPROT 022). Borghesan e colaboradores (2013) realocam a espécie no gênero *Herpetomonas* através da análise de sequências de DNA (gGAPDH, SSUrRNA e ITS rDNA). Nossos resultados para o gene gGAPDH corroboram este resultado e o depósito COLPROT 022 foi renomeado para *H. costoris*, pois o isolado ainda estava com a nomenclatura antiga (Figuras 8, 9 e 50, Anexo I).

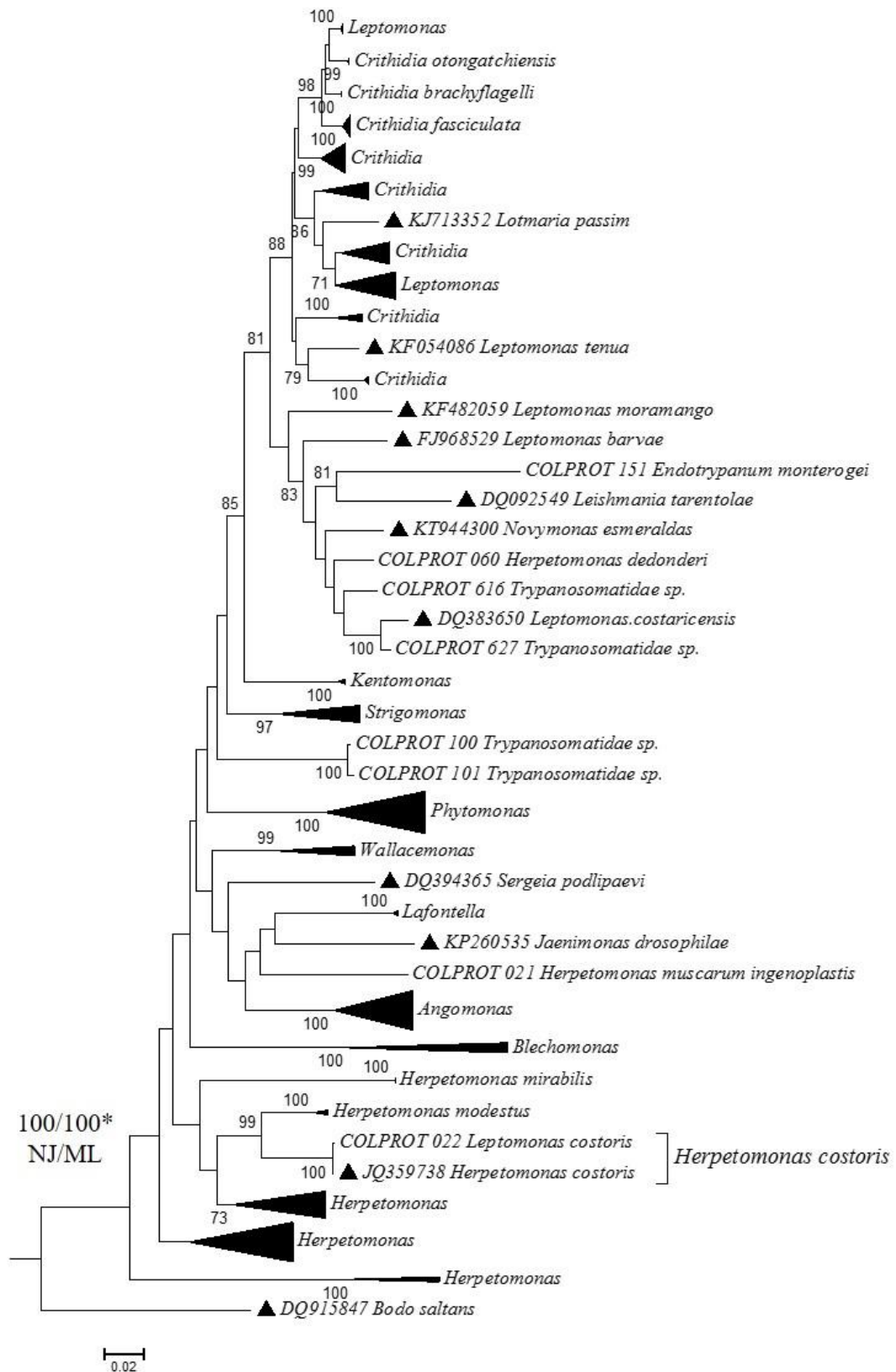


Figura 50- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Herpetomonas costoris*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

#### 4.6. *Angomonas*

O gênero *Angomonas* foi validado por Teixeira e colaboradores (2011) para alocar tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes e que apresentam a forma coanomastigota (Figura 2), mas não estão relacionados ao gênero *Crithidia*.

A espécie *Angomonas ambiguus* foi isolada de *Chrysomya albiceps*, (Diptera) coletada no Mato Grosso do Sul (Brasil) e descrita por Teixeira e colaboradores (2011). O depósito de *A. ambiguus* (COLPROT 702) foi feito pelo Dr. Erney Camargo em 2015. Análises das sequências dos genes gGAPDH e SSU comparadas com as sequências depositadas no GB (gGAPDH HM593019/SSUrRNA HM593015) permitiram a confirmação da identificação taxonômica deste depósito uma vez que agruparam em um clado monofilético e não mostraram divergência genética entre as sequências (Figuras 8-11, 51 e 52, Anexo I).

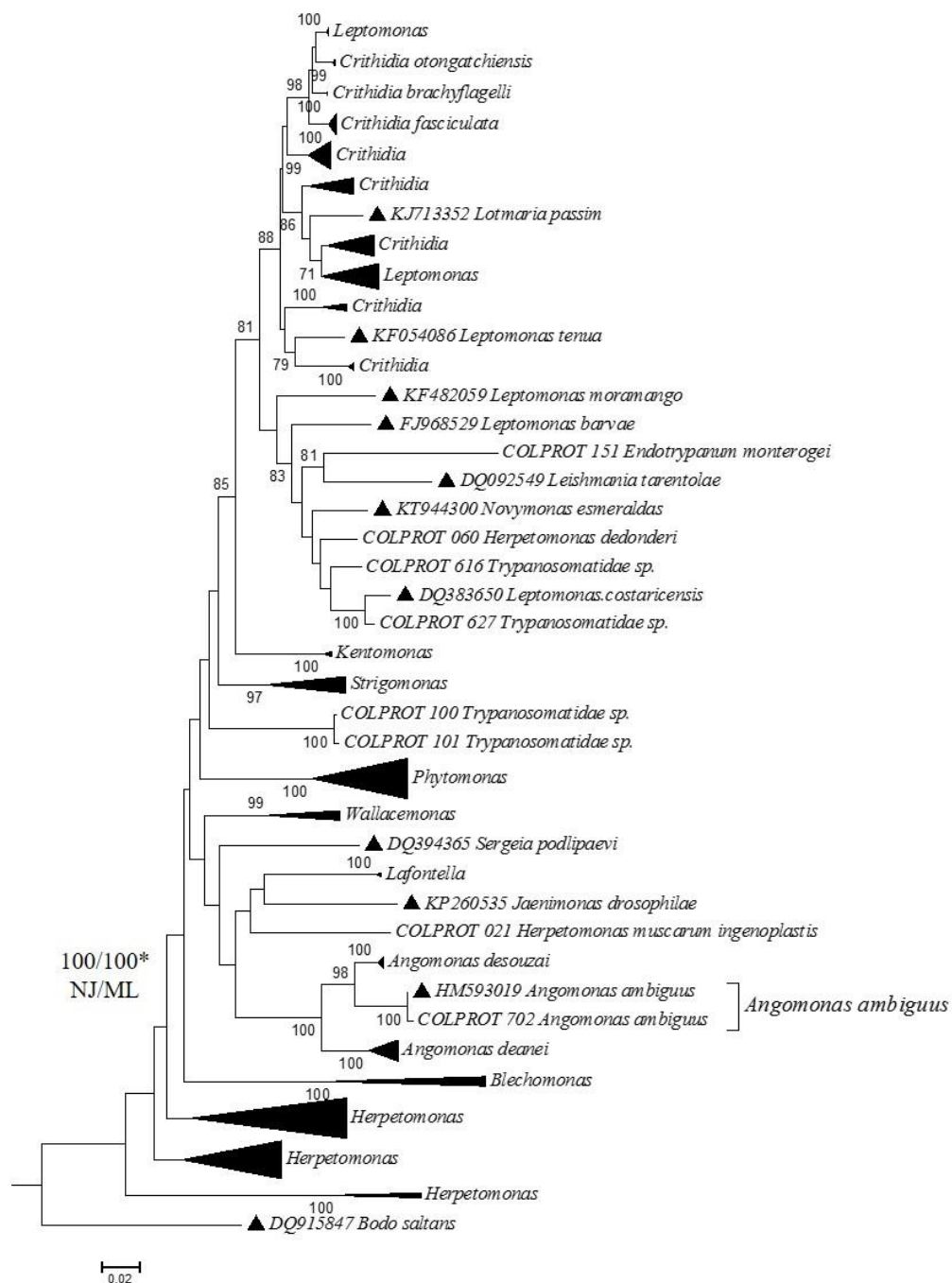


Figura 51- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Angomonas ambiguus*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

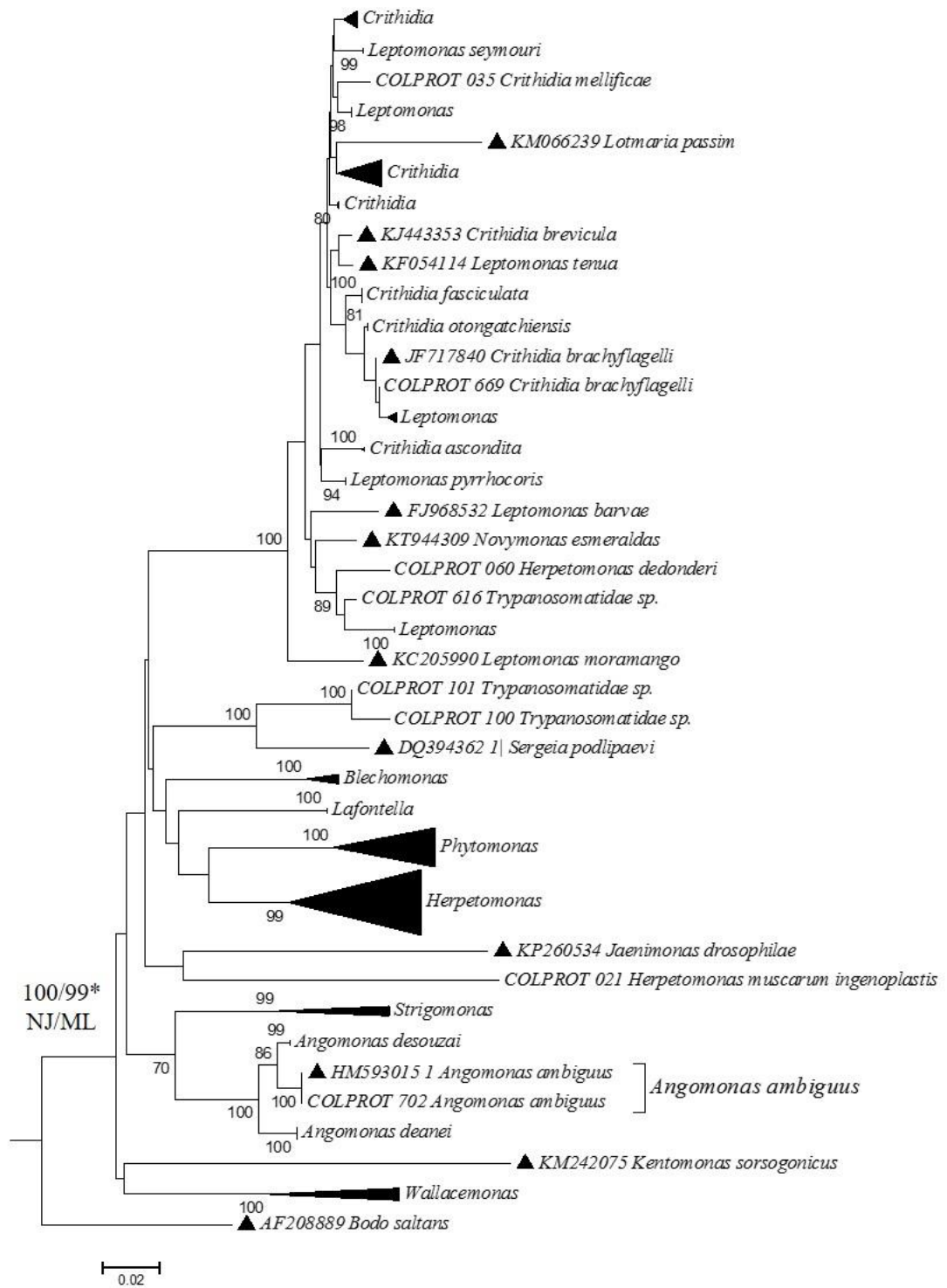


Figura 52- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Angomonas ambiguus*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

*Angomonas desouzai* foi descrita primeiramente como *Crithidia desouzai* por Fiorini e colaboradores (1989) e re-descrita por Teixeira e colaboradores (2011). A Coleção de Protozoários da Fiocruz conta com dois depósitos de *A. desouzai* (COLPROT 109 e 708) depositadas pelo Dr. Erney Camargo em 1995 e 2015, respectivamente. A análise das sequências dos genes gGAPDH e SSU em comparação com as sequências depositadas no GB para os mesmos marcadores (gGAPDH HM593020 e HM593021/ SSU HM593017) permitiram a confirmação taxonômica destes depósitos. Ainda foi possível identificar o depósito COLPROT 704 isolado de *Cyrtoneuropsis conspersa* (Diptera) pelo Dr. Jan Voltýpka no Brasil como um isolado de *A. desouzai* pela análise dos genes gGAPDH e SSU, já que não apresentaram divergência genética com outras sequências de *A. desouzai* (Figuras 8-11, 53 e 54, Anexo I).

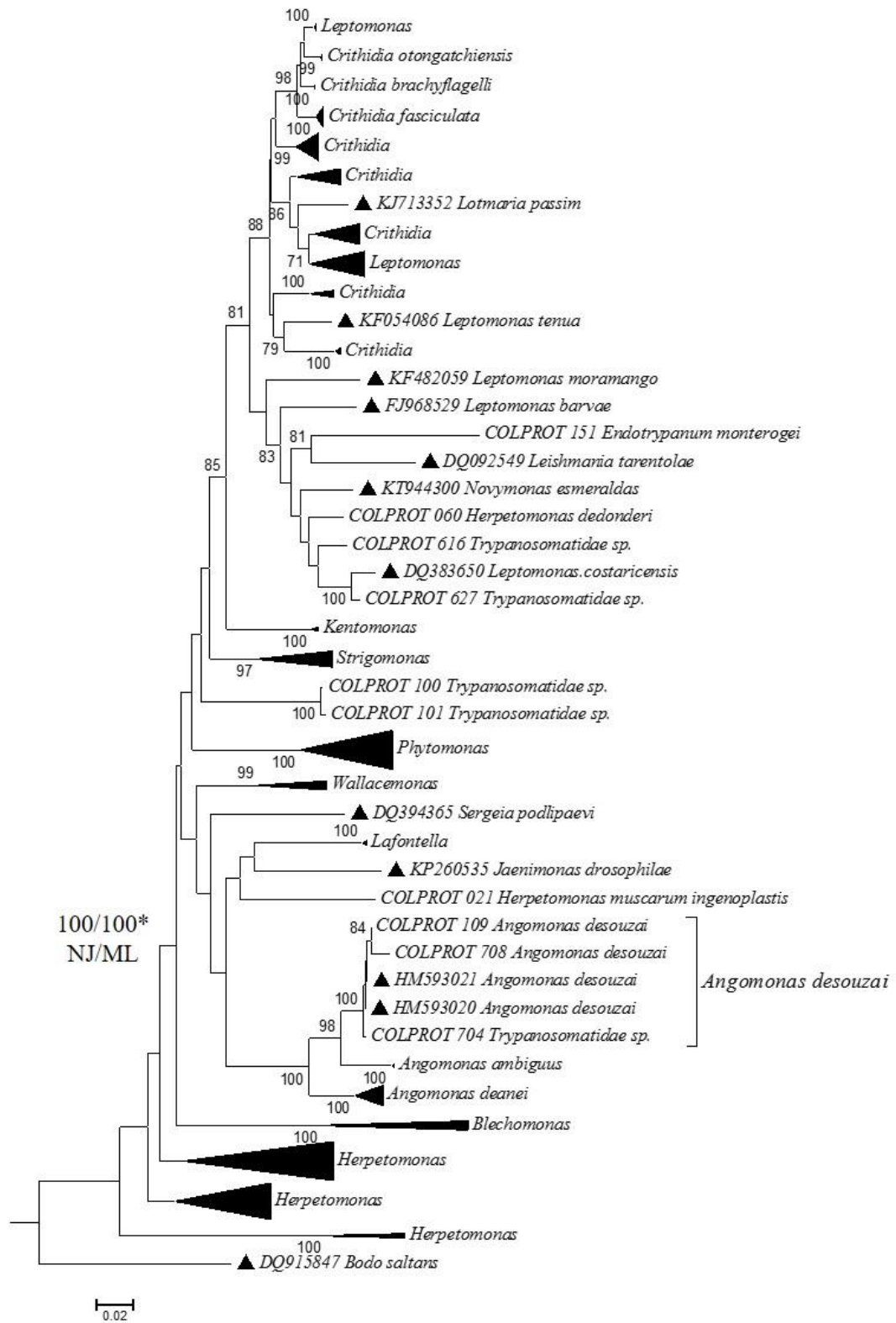


Figura 53- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Angomonas desouzai*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

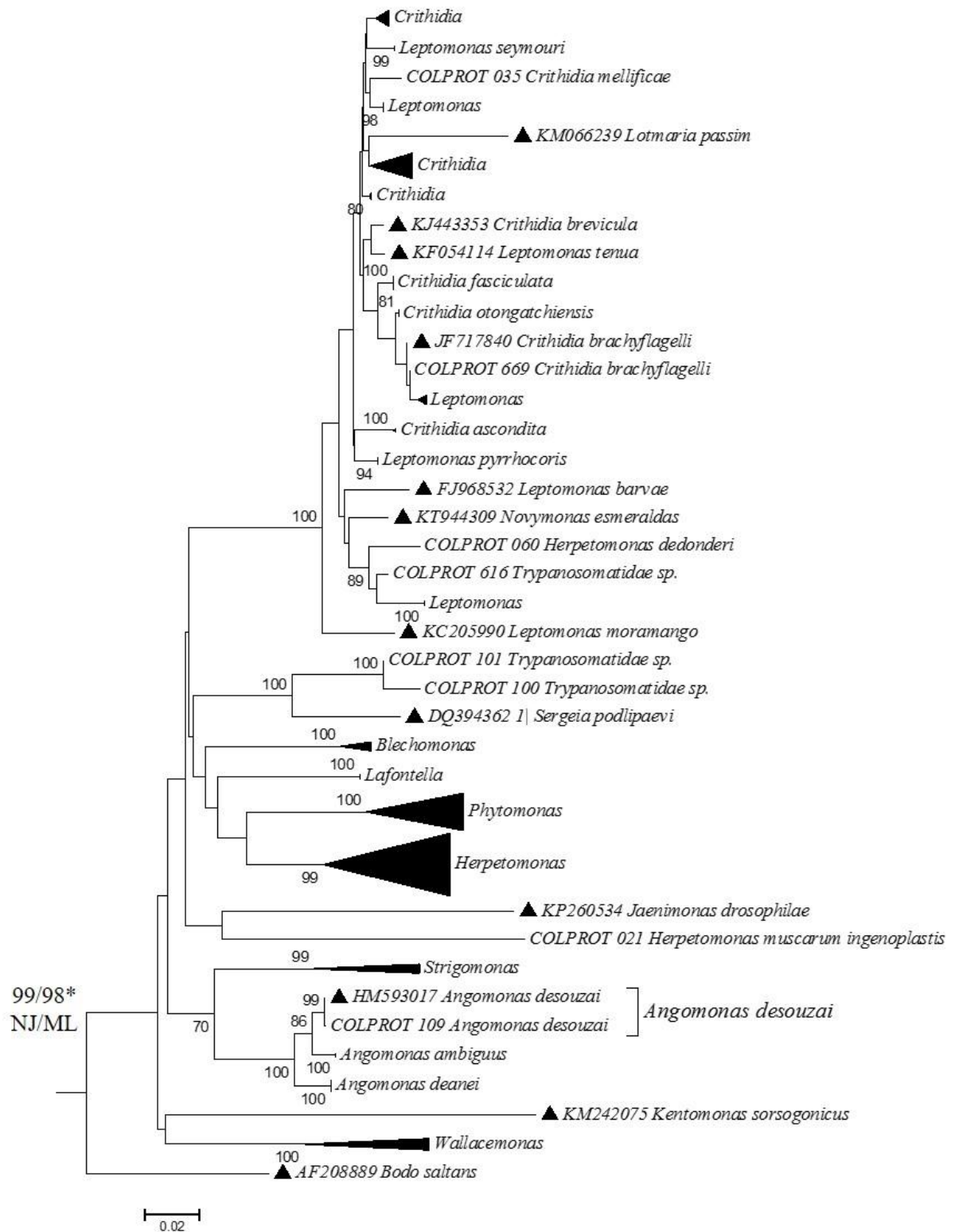


Figura 54- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Angomonas desouzai*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.



*Angomonas deanei* também teve sua identificação re-descrita por Teixeira e colaboradores (2011). A espécie foi primeiramente designada como *Crithidia deanei* por Carvalho e colaboradores (1973). Existem dois depósitos de *A. deanei* (COLPROT 044 e 698), ambas depositadas pelo Dr. Erney Camargo em 1991 e 2015, respectivamente. A confirmação da identidade taxonômica destes depósitos foi possível através da análise das sequências geradas para os alvos gGAPDH e SSU em comparação com as sequências depositadas no GB (gGAPDH HM59302, HM593023, HM593024, 2EU079130 e EU079131 / SSU HM593011), apresentando entre 0-3 % de divergência genética. Um depósito sem identificação taxonômica prévia (COLPROT 226) isolado de amora pôde ser classificado também como *A. deanei* pela análise de fragmentos de gGAPDH, que apresentaram 0-3% de divergência genética. Já o marcador SSU não apresentou divergência genética entre as sequências analisadas (Figuras 8-11, 55 e 56, Anexo I). As espécies descritas como *A. deanei* formam um clado monofilético bem definido.

No estudo realizado por Teixeira *et al.*, 2011, os autores observaram através do sequenciamento dos genes gGAPDH, SSUrRNA e ITS, que *Herpetomonas roitmani* é mais relacionada com uma das linhagens do gênero *Angomonas* do que com as espécies de *Herpetomonas*, sinonimizando-a em *A. deanei*. Nossas análises das sequências dos genes gGAPDH e SSUrRNA corroboram esse resultado, e por isso renomearemos nosso isolado identificado como *H. roitmani* (COLPROT 212) em *A. deanei*.

*H. roitmani* foi isolada e caracterizada primeiramente por Fiorini e colaboradores (1989) como uma nova espécie do gênero *Crithidia*, pois apresentava forma coanomastigota. Fiorini e colaboradores já suspeitavam da presença de endossimbionte no novo isolado, já que sua exigência nutricional era baixa. Apesar da forma coanomastigota, típica do gênero *Crithidia*, o parasito apresenta o cinetoplasto posterior ao núcleo, o que caracteriza a forma opistomastigota, forma clássica do gênero *Herpetomonas*. A identidade da espécie foi modificada por Faria e Silva e colaboradores (1991) em um estudo detalhado da ultraestrutura do parasito associado a uma análise molecular por perfil de isoenzimas. O padrão de bandas se mostrou bem distinto de *Crithidia* e o flagelado passou a ser conhecido como *H. roitmani*. Vale ressaltar que outros trabalhos já sugeriam a realocação da espécie *H. roitmani*. Brandão e colaboradores (2000) sugeriram que *H. roitmani* fosse reclassificada através da observação do tamanho do kDNA. Em 2004, d'Avila-Levy e colaboradores reafirmam a necessidade da realocação desta espécie com base nas observações do perfil de glicoconjugados. Esse é um exemplo clássico da vantagem da

biologia molecular em estudos taxonômicos de tripanossomatídeos. Sem a utilização de marcadores genéticos, o reconhecimento desta espécie em seu táxon correto (*A. deanei*) encontraria maior resistência (Figuras 8-11, 55 e 56, Anexo I).

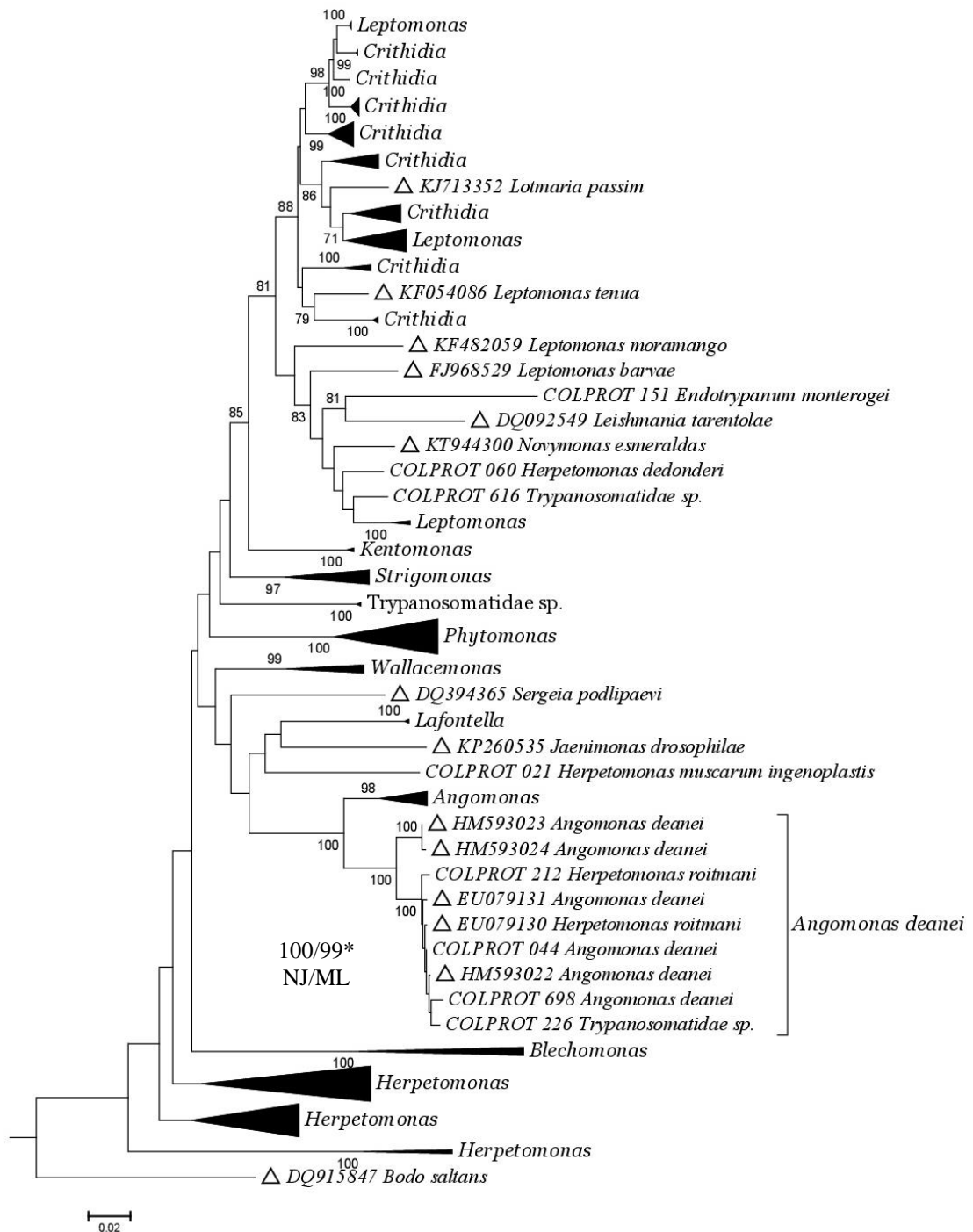


Figura 55- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Angomonas deanei*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

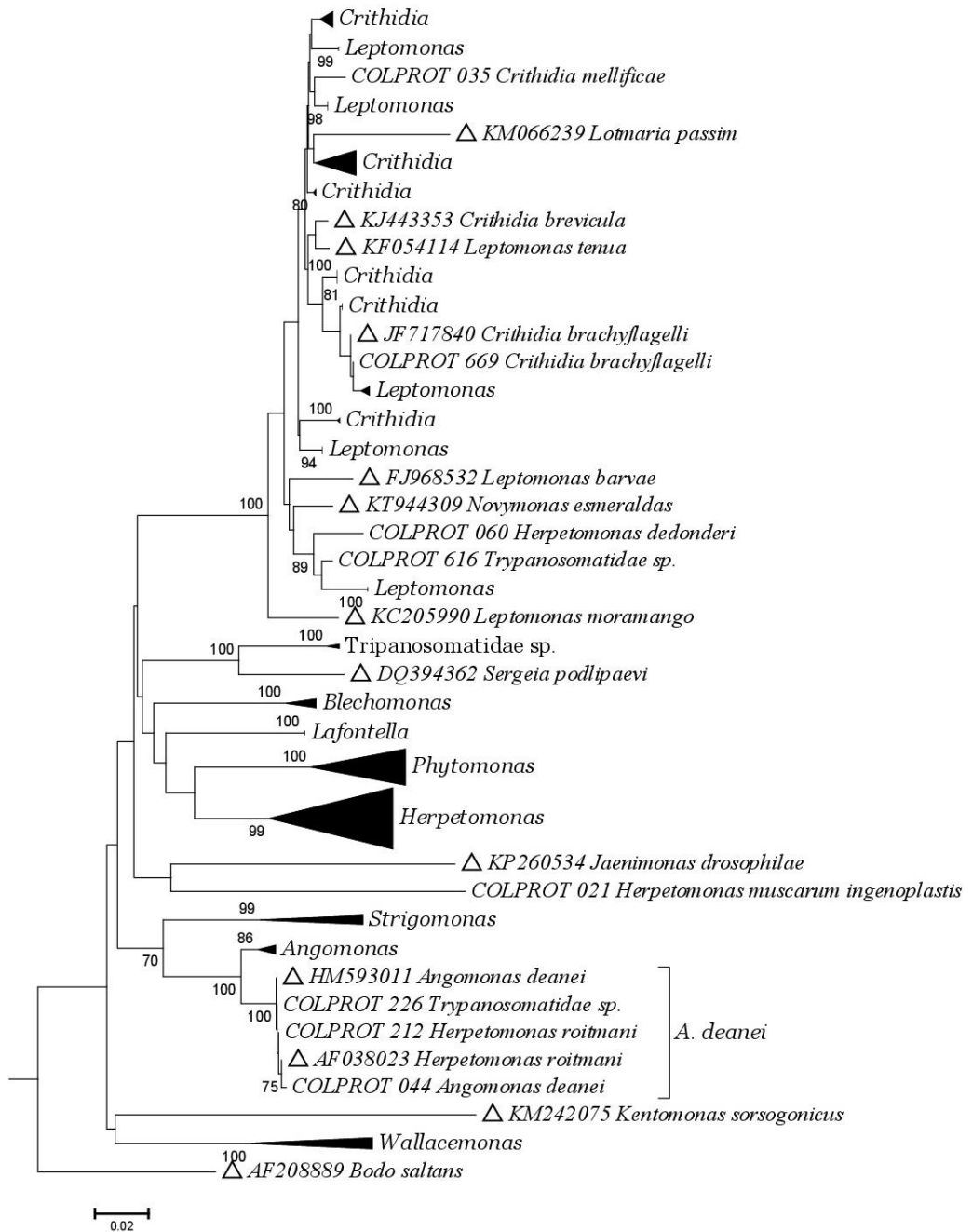


Figura 56- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Angomonas deanei*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

#### 4.7. *Strigomonas*

O gênero *Strigomonas* foi descrito para acomodar tripanossomatídeos com formas e comprimentos variados, em alguns casos, com longos flagelos e com a presença de um endossimbionte.

A espécie *Strigomonas oncopelti* descrita por Teixeira e colaboradores (2011) já foi conhecida como *Crithidia oncopelti* (Gill et Vogel, 1963). A Coleção de protozoários conta com dois depósitos de *S. oncopelti* (COLPROT 019 e 055) que foram submetidas às análises moleculares. Ambos os depósitos tiveram a identificação taxonômica confirmada através da análise dos marcadores gGAPDH e SSU em comparação com sequências depositadas no GB (gGAPDH EU079135/ SSU AF038025). Não foi observada divergência genética entre as sequências alvo e as sequências-referência, além de agruparem monofileticamente (Figuras 8-11, 57 e 58, Anexo I).

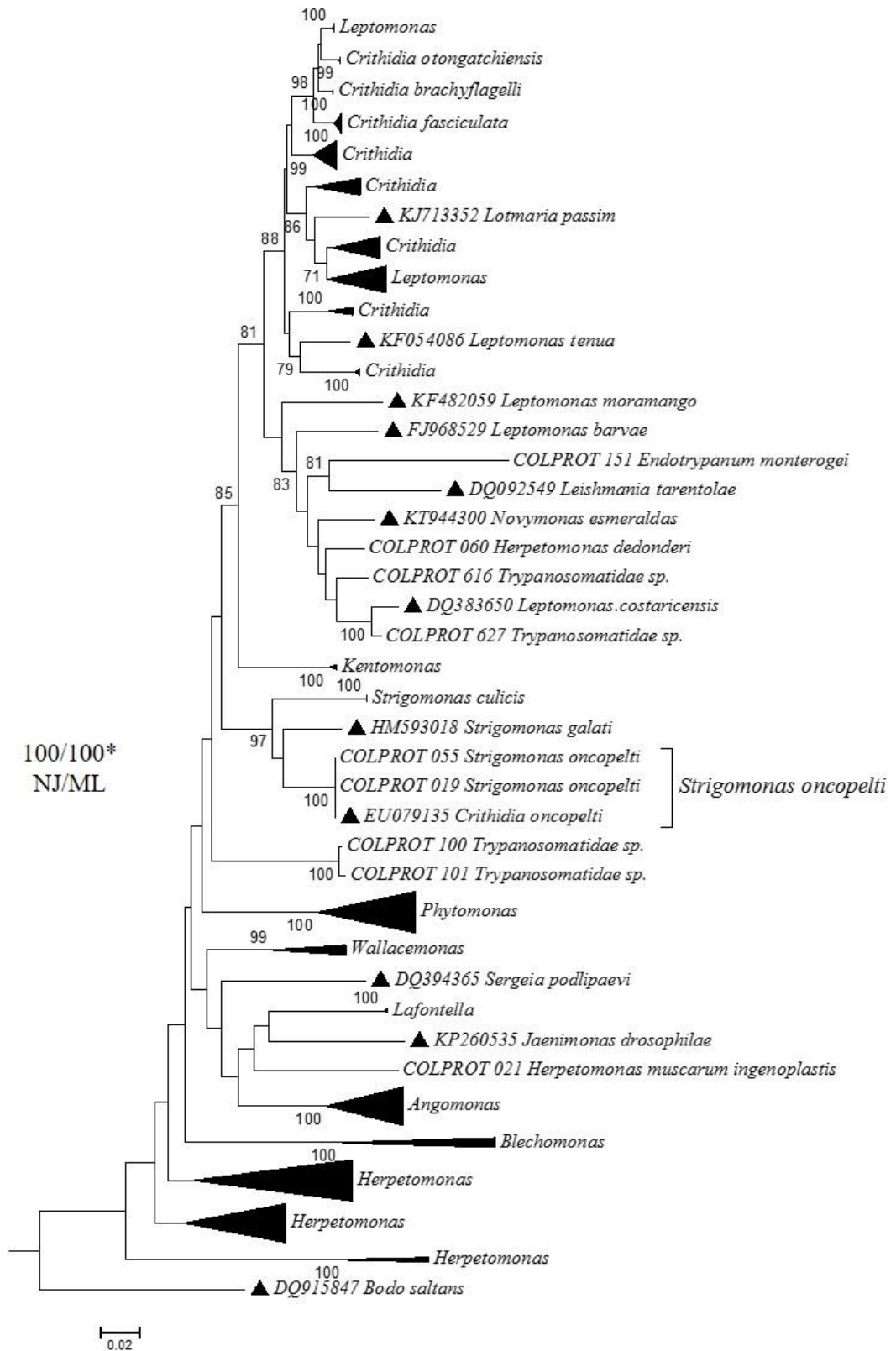


Figura 57- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Strigomonas oncopelti*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

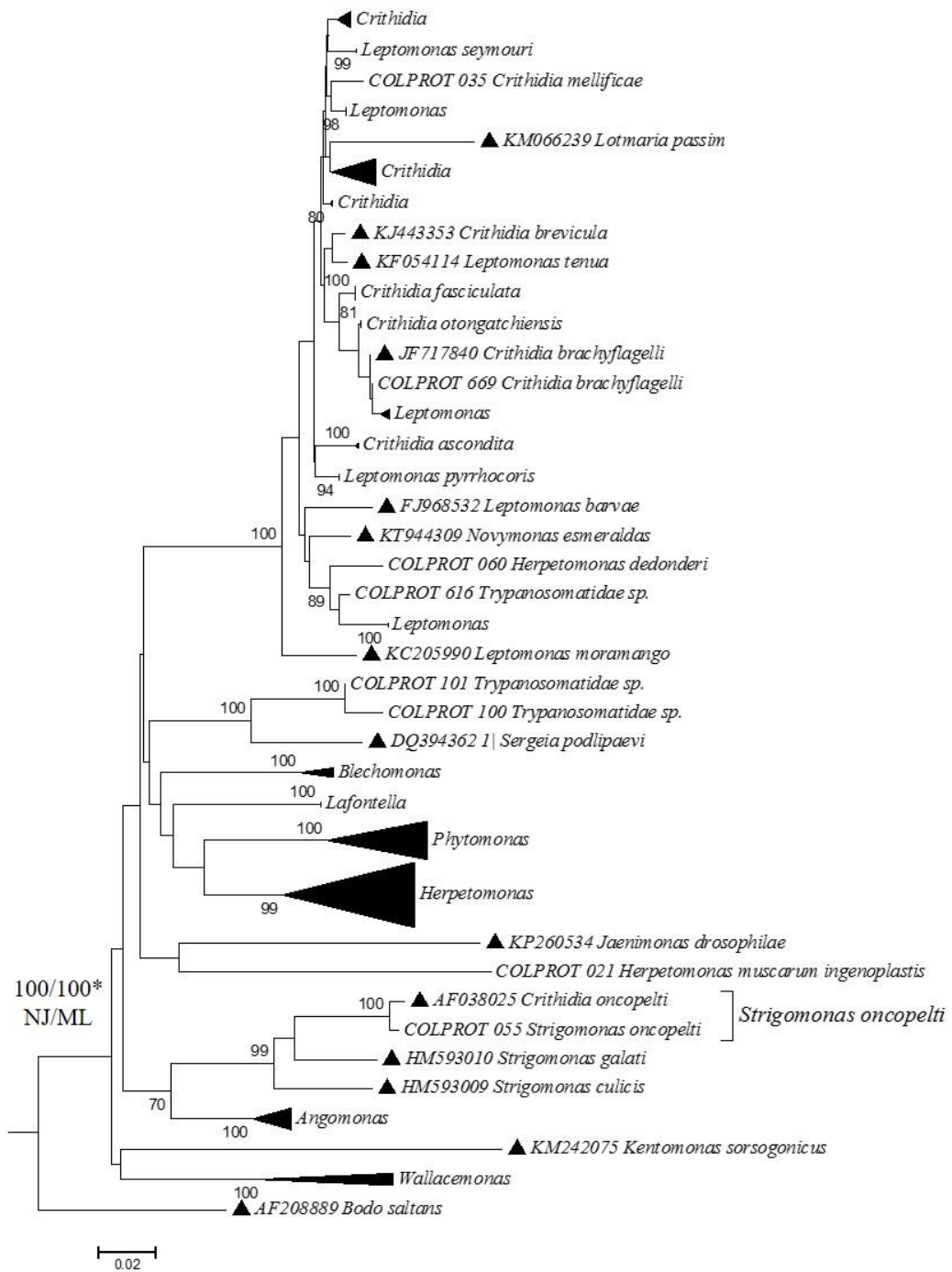


Figura 58- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Strigomonas oncopelti*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Outra espécie deste gênero depositada na Coleção é *Strigomonas culicis*, anteriormente denominada *Blastocrithidia culicis* por Wallace et Johnson (1961) e renomeada também por Teixeira e colaboradores (2011). A identidade taxonômica dos depósitos (COLPROT 034 e 041) foi confirmada através da análise comparativa de sequências do gene gGAPDH das amostras e uma sequência referência (EU079137), que não apresentaram divergência genética entre si e formaram um clado monofilético para este marcador (Figuras 8, 9 e 59, Anexo I).

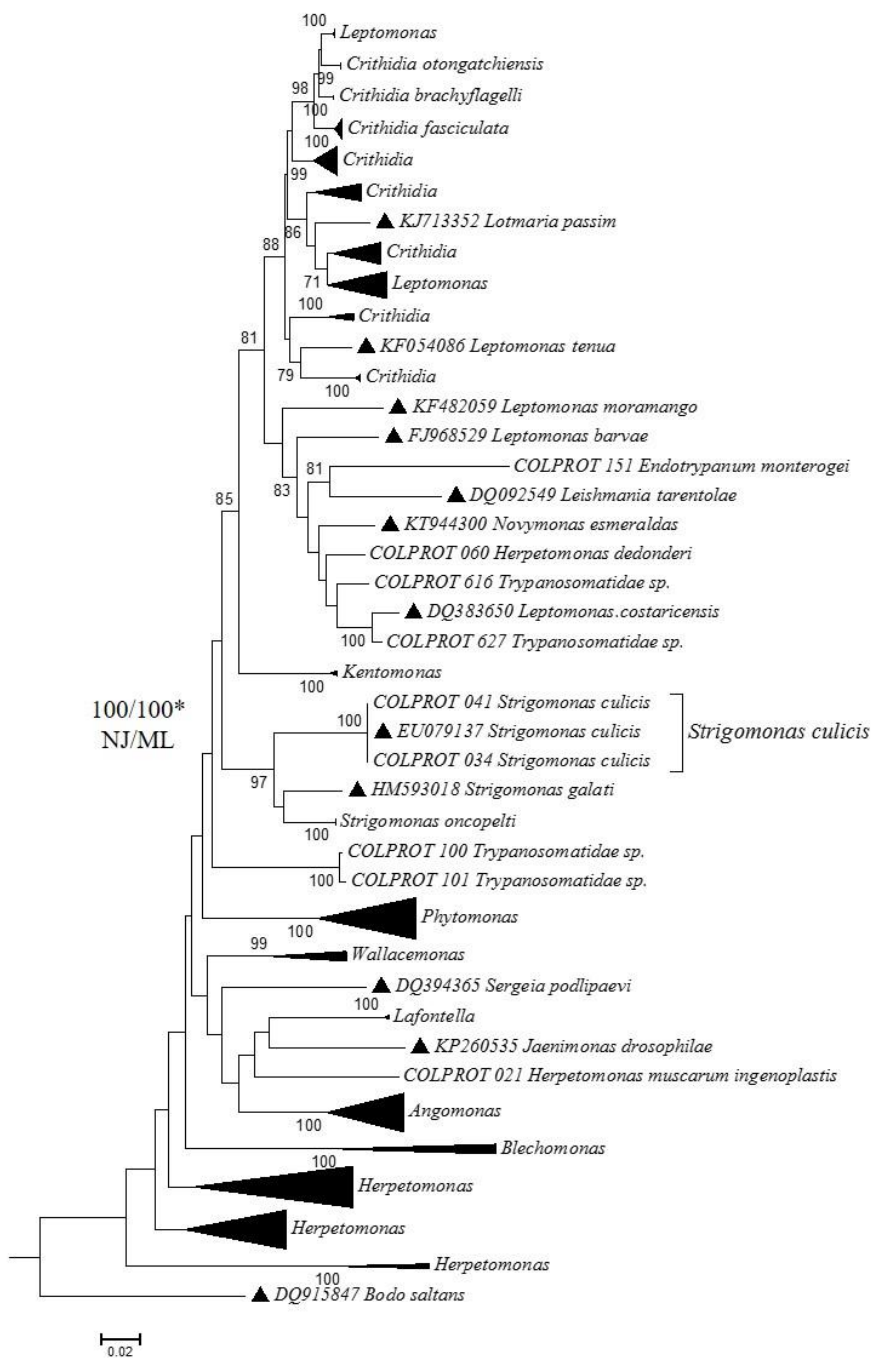


Figura 59- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Strigomonas culicis*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

#### 4.8. *Kentomonas*

O gênero *Kentomonas* foi descrito recentemente para alocar um flagelado que apresentava um endossimbionte diferente dos apresentados pelos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas*. Conta apenas com *Kentomonas sorsogonicus* como espécie descrita até o momento (Votýpka *et al.*, 2014). A Coleção de Protozoários recebeu um depósito desta espécie (COLPROT 696) pelo Dr. Vyacheslav Yurchenko em 2015. A partir da análise do gene gGAPDH foi possível confirmar a identidade taxonômica deste depósito. Esta sequência é idêntica àquela depositada no GB (KM242072) (Figuras 8, 9 e 60, Anexo I).

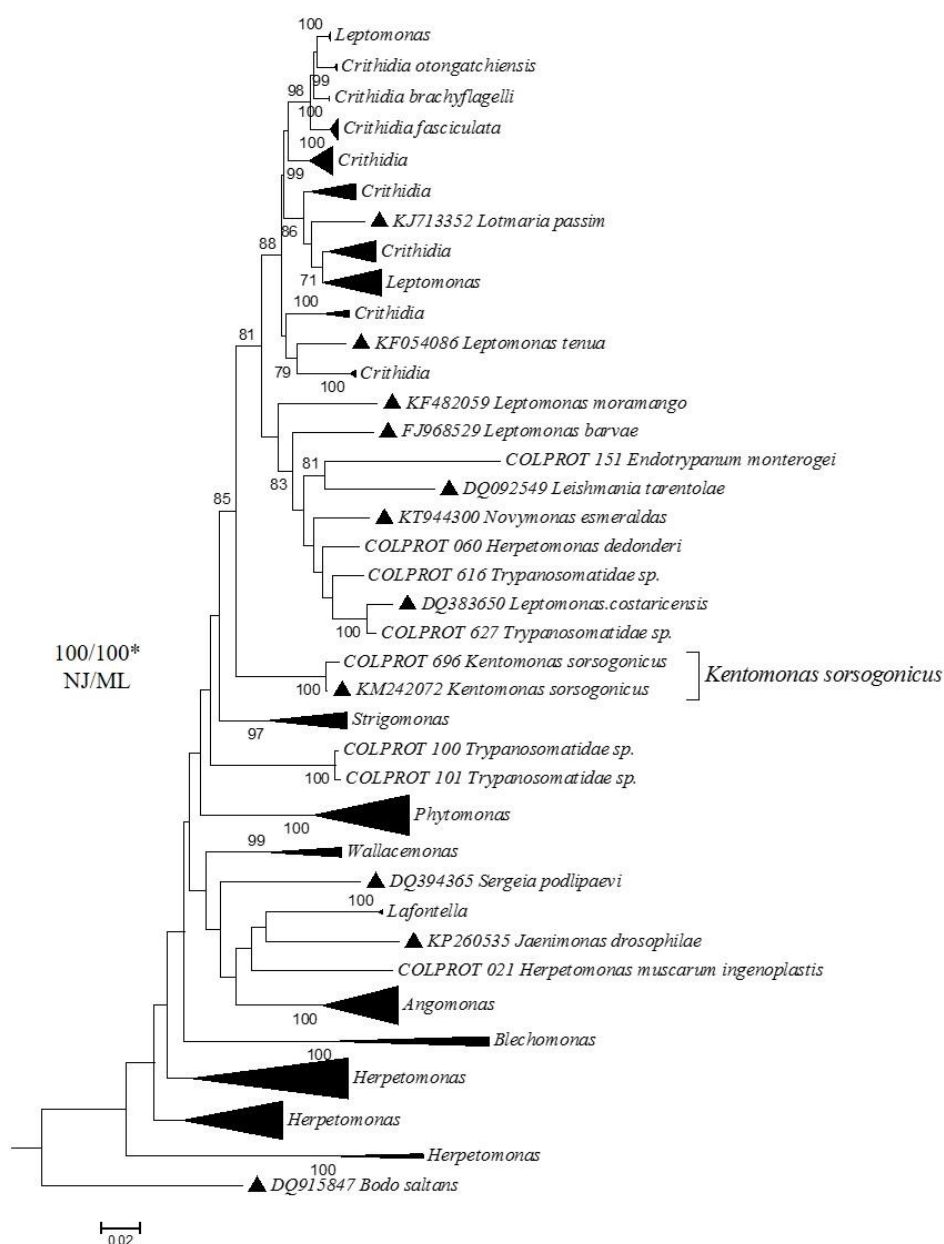


Figura 60- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Kentomonas sorsogonicus*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.



#### 4.9. *Phytomonas*

*Phytomonas*, o único grupo de heteroxênicos abordado nesse trabalho, apresenta duas formas evolutivas: amastigotas e promastigotas (Figura 2), e alterna seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado e uma planta. Estes parasitos representam pragas agrícolas especialmente para espécies de tomateiros, coqueiros, café e palmeiras. A caracterização do gênero, durante muitos anos, foi baseada em dois critérios: a presença de formas promastigotas e a ocorrência em plantas. No entanto, além de possuir o inseto como vetor, este morfotipo não é exclusivo do gênero, isso levou a uma série de incongruências na identificação taxonômica deste grupo. Além disso, outros gêneros já foram reportados em plantas (Camargo, 1999).

A espécie *Phytomonas serpens* foi primeiramente isolada da polpa de tomates (*Solanum lycopersicum*) na África do Sul e recebeu o nome de *Leptomonas serpens* por Gibbs (Gibbs 1957 *apud* Jankevicius *et al.*, 1989). A nomenclatura foi alterada para *P. serpens* por Podlipaev em 1986 (*apud* Jankevicius *et al.*, 1989). Este parasito é de fácil isolamento e cultivo, ao contrário de outras espécies do mesmo gênero, que são encontrados principalmente no látex e na seiva de plantas. Por apresentar um fácil cultivo, *P. serpens* se tornou um excelente modelo para estudos bioquímicos e moleculares (Carvalho *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1995; Pappas *et al.*, 2005; d'Avila-Levy *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).

O clado que inclui a espécie válida de *Phytomonas serpens*, representada pelos depósitos 174, 186, 189 e 675 da COLPROT, agrupa também outros depósitos sem identificação prévia em um único clado monofilético: COLPROT 080, isolado de *Citrus bergamia* (Sapindales), COLPROT 083, isolado de *Jatropha macrantha* (Malpighiales), COLPROT 187 e 247, isolados de *Solanum lycopersicum* (Solanales), COLPROT 188, que não apresenta informação de isolamento, e COLPROT 245, isolado de *Phthia picta* (Hemiptera). Esses depósitos não apresentam divergência genética com as sequências de *P. serpens* depositadas na COLPROT e no *Genbank* (gGAPDH HQ685123/ SSU AF016320) para os marcadores analisados, permitindo concluir que são isolados desta espécie (Figuras 8-11, 61 e 62, Anexo I).

Um outro caso de mudança de gênero após análises filogenéticas aconteceu com a espécie *Herpetomonas mcgheeii* (Jankevicius *et al.*, 1993). Esta espécie foi isolada a partir da glândula salivar de *Leptoglossus zonatus* (Hemiptera) e descrita com base na morfologia do parasito e seu desenvolvimento no hospedeiro. Alguns autores já relataram através da análise

de sequência de RNA SL e SSU rRNA que a espécie *H. mcgheeii* poderia ser realocada no gênero *Phytomonas* (Camargo, 1999; Teixeira *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1999; Borghesan *et al.*, 2013). A coleção de Protozoários da Fiocruz conta com um depósito da espécie *H. mcgheeii*, realizado pelo próprio Dr. Jankevicius em 1996 (COLPROT 161). De acordo com nossos resultados, a análise das sequências dos genes gGAPDH e SSUrRNA indicaram que esta espécie foi agrupada em um clado monofilético formado por isolados de *Phytomonas serpens*, não apresentando divergência genética, o que nos faz sugerir a sinonímia destas espécies (Figuras 8-11, 61 e 62, Anexo I).

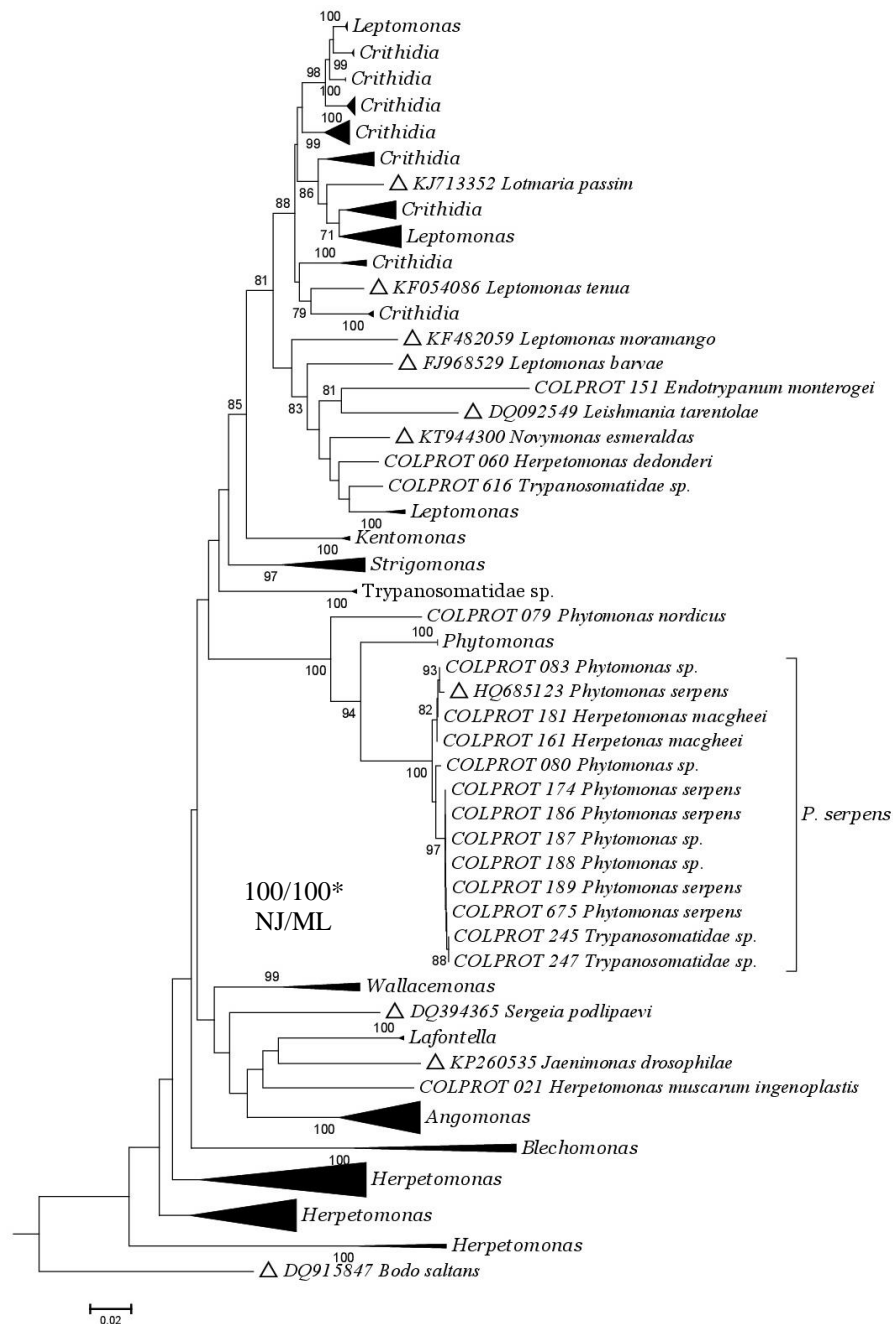


Figura 61- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas serpens*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

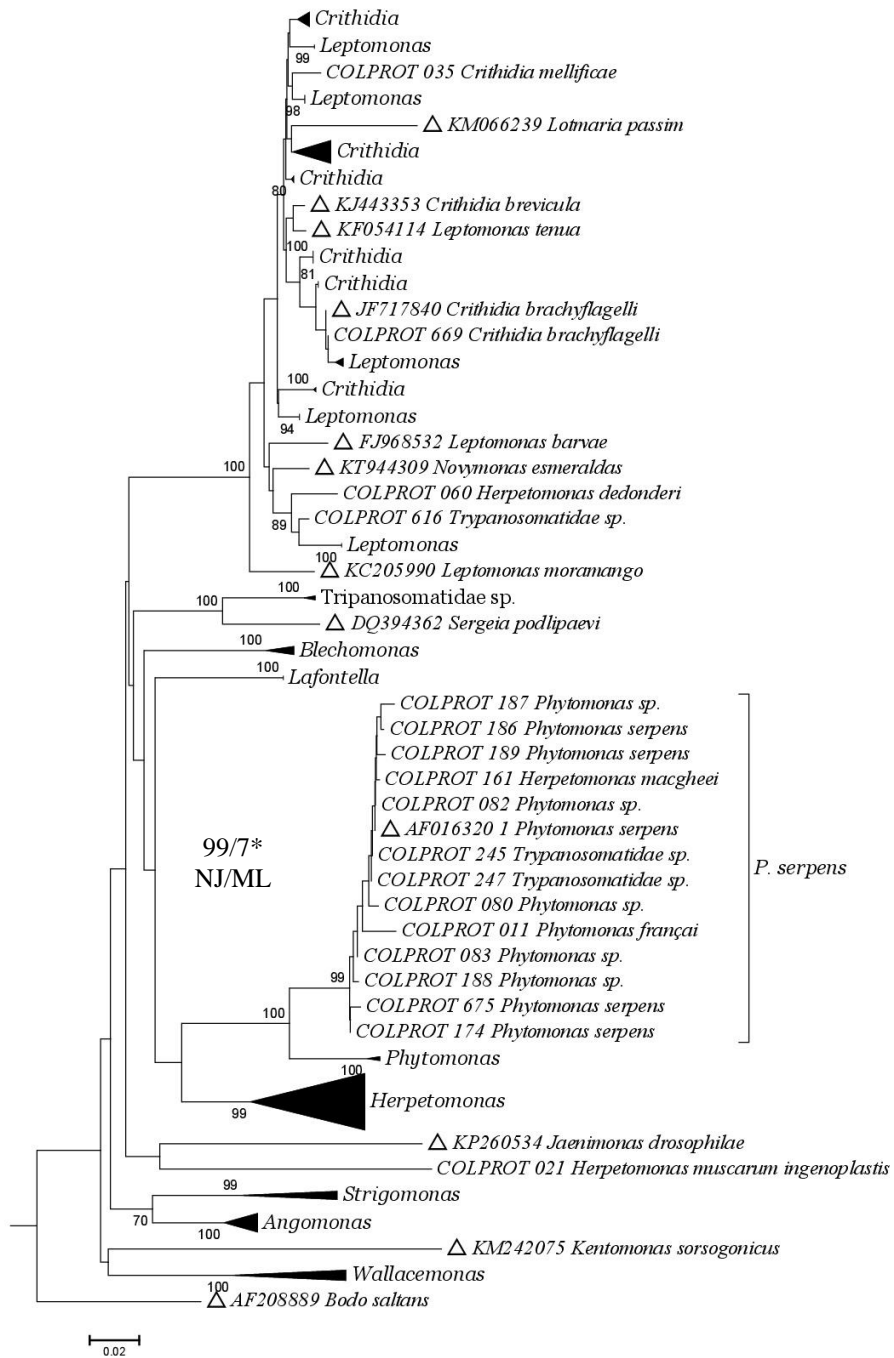


Figura 62- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas serpens*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

Outra espécie do gênero depositada na coleção é *Phytomonas françai* (COLPROT 011). Esta espécie tem sido isolada de mandioca e foi descrita primeiramente por Aragão (1931). A análise das sequências do marcador gGAPDH revelou que outro depósito da coleção (COLPROT 082) sem identificação prévia, isolado em *Euphorbia pinea* (Euphorbiales), representa também um isolado de *P. françai*. As análises foram feitas em comparação apenas com nossos depósitos, uma vez que não há sequência disponível em bancos públicos para esta espécie (Figuras 8-11, 62 e 63, Anexo I). A divergência genética entre as espécies de *P. serpens* depositadas na coleção e *P. françai* é de 7% para o alvo gGAPDH e de pelo menos 1,4 % para o alvo SSUrRNA (Anexo V). No entanto, SSU não foi congruente na separação da espécie de *P. françai* e *P. serpens*, agrupando todos os espécimes em um único clado (Figuras 10, 11 e 62). Portanto, novas análises incluindo de morfologia, comportamento em cultivo e análises bioquímicas, além do sequenciamento de outros alvos com SL, ITS e COI ainda se fazem necessários para confirmação do status taxonômico de *P. serpens* como uma espécie distinta de *P. françai*.

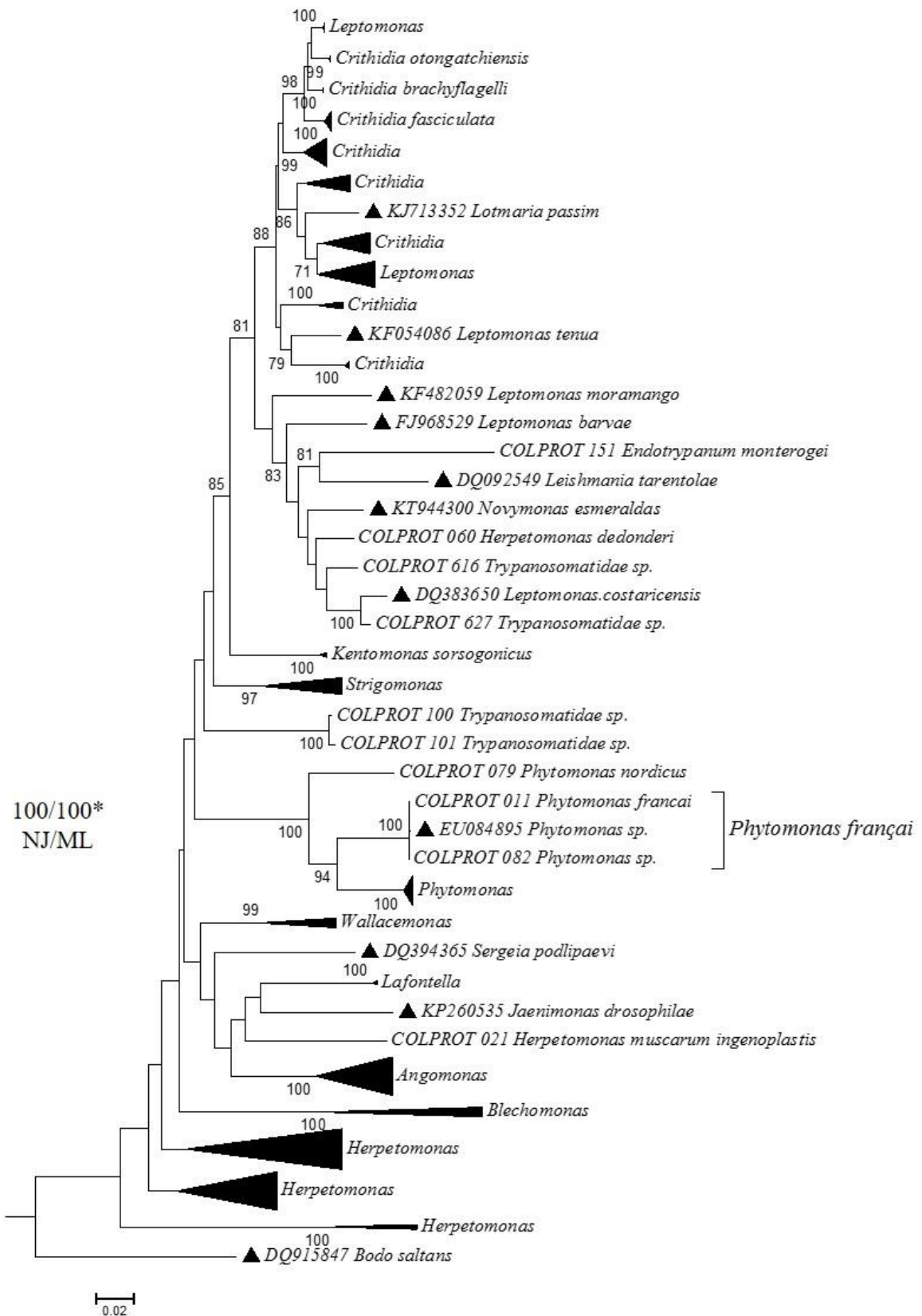


Figura 63- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas francai*. (\*) representa valores de bootstrap para ambas as análises.

Foi possível ainda a identificação de um depósito de *Phytomonas* (COLPROT 079) feito pela Dra. Marta Teixeira em 1992. O isolado foi depositado como *Phytomonas* sp., isolado de *Allamanda cathartica* (Gentianales). Não há outras informações a respeito deste isolado nos registros da coleção. Este depósito foi identificado como *Phytomonas nordicus* (Frolov *et al.* 1993) pela análise do gene SSUrRNA que apresentou 1% de divergência genética com a sequência de referência do GB KT223609 (Frolov *et al.*, 2016) (Figuras 10, 11 e 64, Anexo I) e formou um clado monofilético distinto das outras espécies de *Phytomonas*.

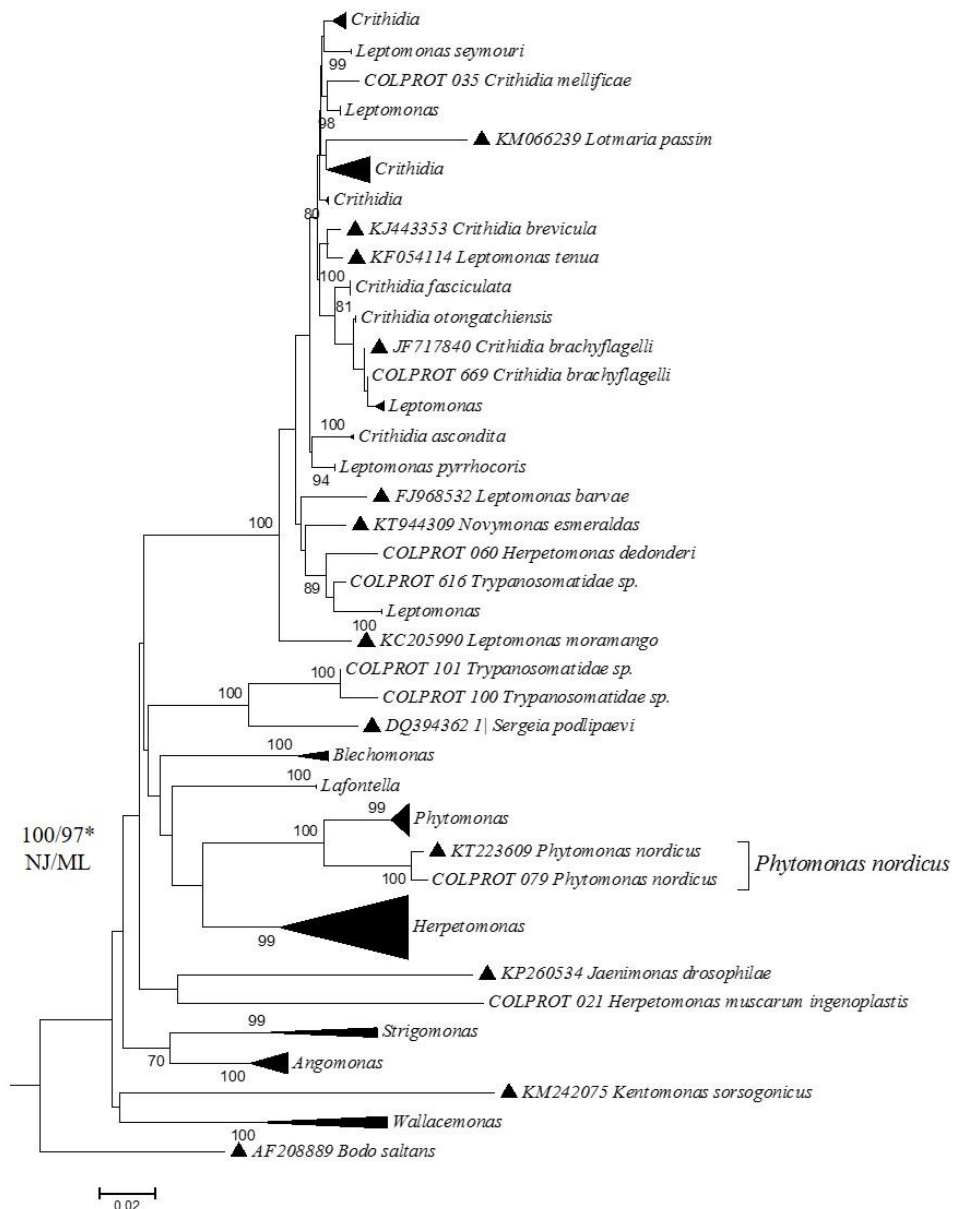


Figura 64- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU para o grupo que inclui a espécie *Phytomonas nordicus*. (\*) representa valores de *bootstrap* para ambas as análises.

#### **4.10. Identificação de tripanossomatídeos com potencial de representarem novos gêneros e espécies**

Os depósitos (COLPROT 617 a 623) são clones de um único isolado de *Rasahus surinamensis* (Reduviidae) (COLPROT 616) e estão agrupados em um único clado monofilético, o que confirma que não havia infecção mista no hospedeiro. As análises de gGAPDH e SSU rRNA (Figuras 8-11, 65 e 66, Anexo I) confirmam este isolado como um membro da família Trypanosomatidae, formando um clado irmão ao gênero *Leptomonas*. A análise do gene COI também confirma que este isolado não agrupa com nenhuma outra espécie conhecida e sequenciada, indicando se tratar de uma nova espécie (Figuras 12, 13 e 67, Anexo I). No entanto, o número de espécies sequenciadas com o gene COI ainda é insuficiente para sustentar esta hipótese. Com base nas análises de divergência genética entre estas sequências e aquelas depositadas no GB foi possível observar 5% de divergência genética para o alvo gGAPDH com a espécie *L. costaricensis* (DQ383650) e 2% de divergência genética com o alvo SSUrRNA para a mesma espécie (DQ383648). Esse resultado sustenta a hipótese de que este isolado esteja relacionado ao gênero *Leptomonas*. Entretanto, outras análises são necessárias para confirmar estes isolados como *L. costaricensis* ou ainda uma nova espécie do gênero.

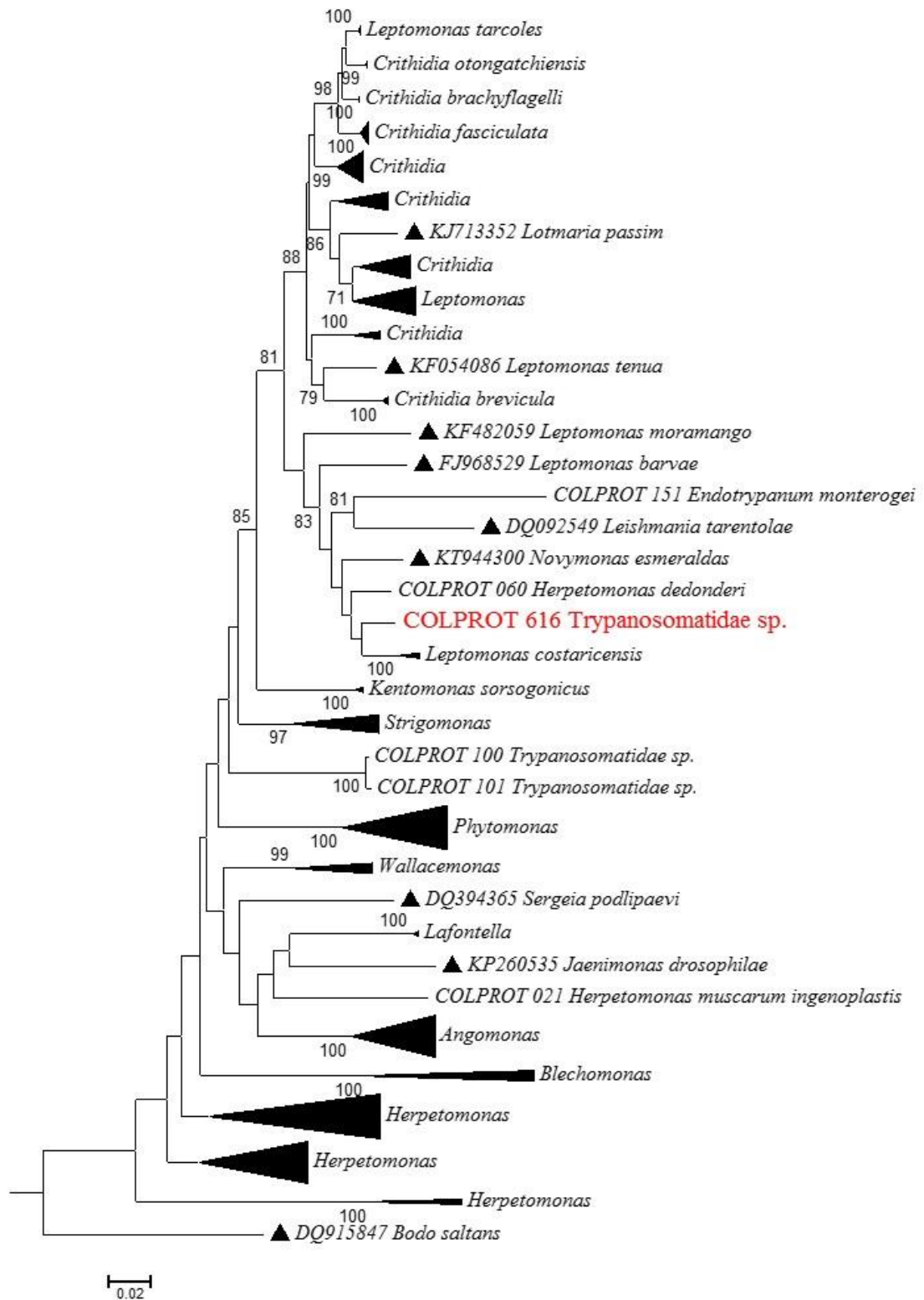


Figura 65- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.



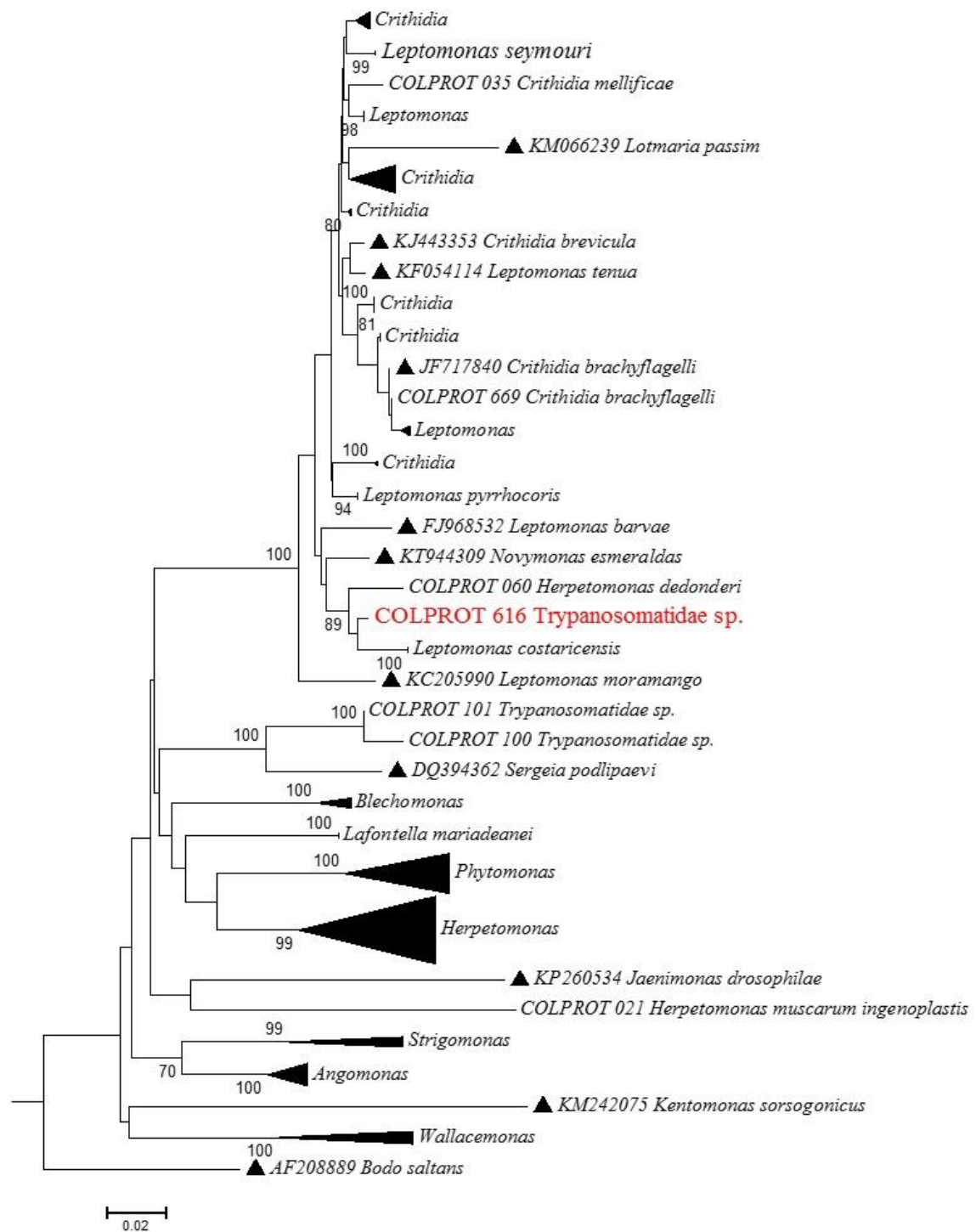


Figura 66- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.

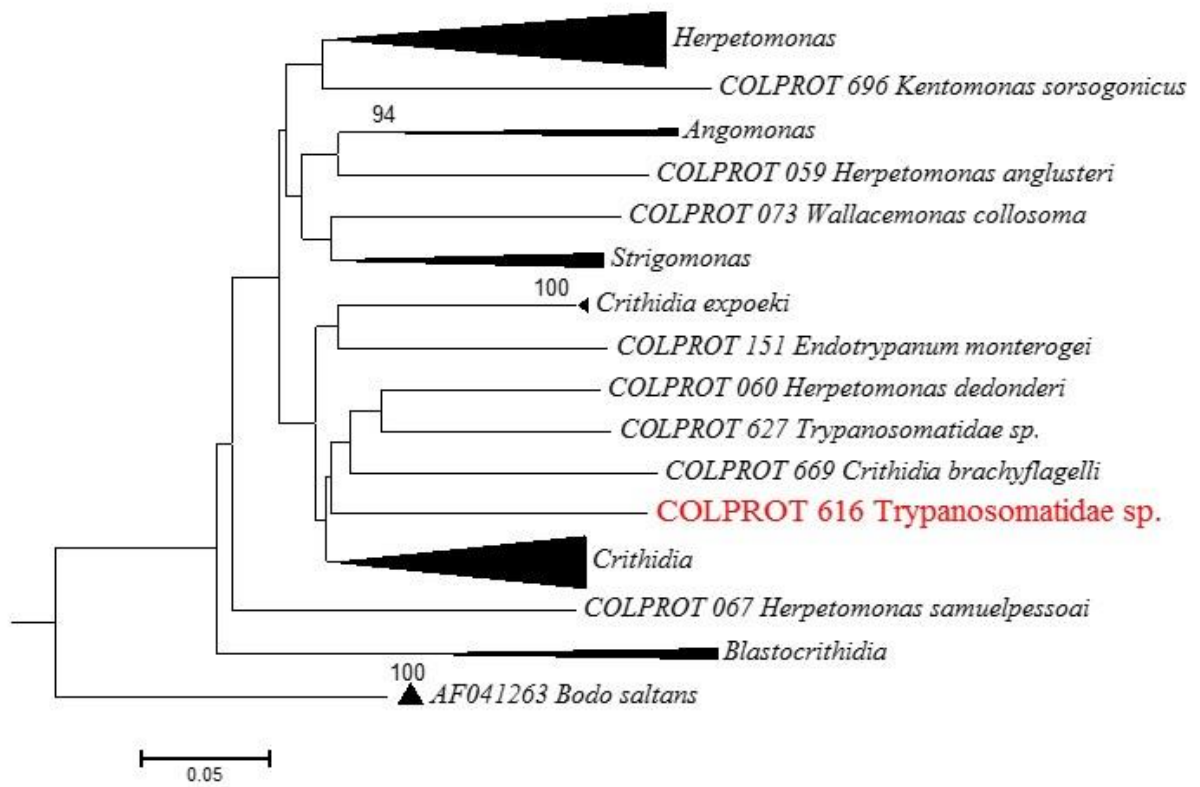


Figura 67- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.

Dados moleculares e morfológicos indicam que *Herpetomonas dedonderi* (Dedet *et al.*, 1986) não pertence ao gênero *Herpetomonas* e nem se encaixa no gênero *Crithidia*, apesar de apresentarem a forma coanomastigota em cultura (Teixeira *et al.*, 1997; Borghesan *et al.*, 2013). A coleção conta com um depósito de *H. dedonderi* (COLPROT 060) e pela análise dos genes gGAPDH, SSUrRNA e COI, nossos resultados mostram que a divergência genética entre a sequência da espécie de *H. dedonderi* depositada na COLPROT e a sequência da espécie *Leptomonas costaricensis* depositada no Genbank (gGAPADH DQ383650 e SSUrRNA DQ383648) é de 5% (gGAPDH) e 2% (SSUrRNA). Também foi possível observar uma divergência genética de 10% para o gene COI. Apesar de serem geneticamente próximos, a porcentagem da divergência para os marcadores não sustenta uma sinonímia entre as espécies. Entretanto, com base nesses valores é possível sugerir que *H. dedonderi* esteja mais relacionada ao gênero *Leptomonas*, sendo sugerida sua realocação para o gênero *Leptomonas* e renomeação para *Leptomonas dedonderi* (Figuras 8-13, 68-70, Anexo I).

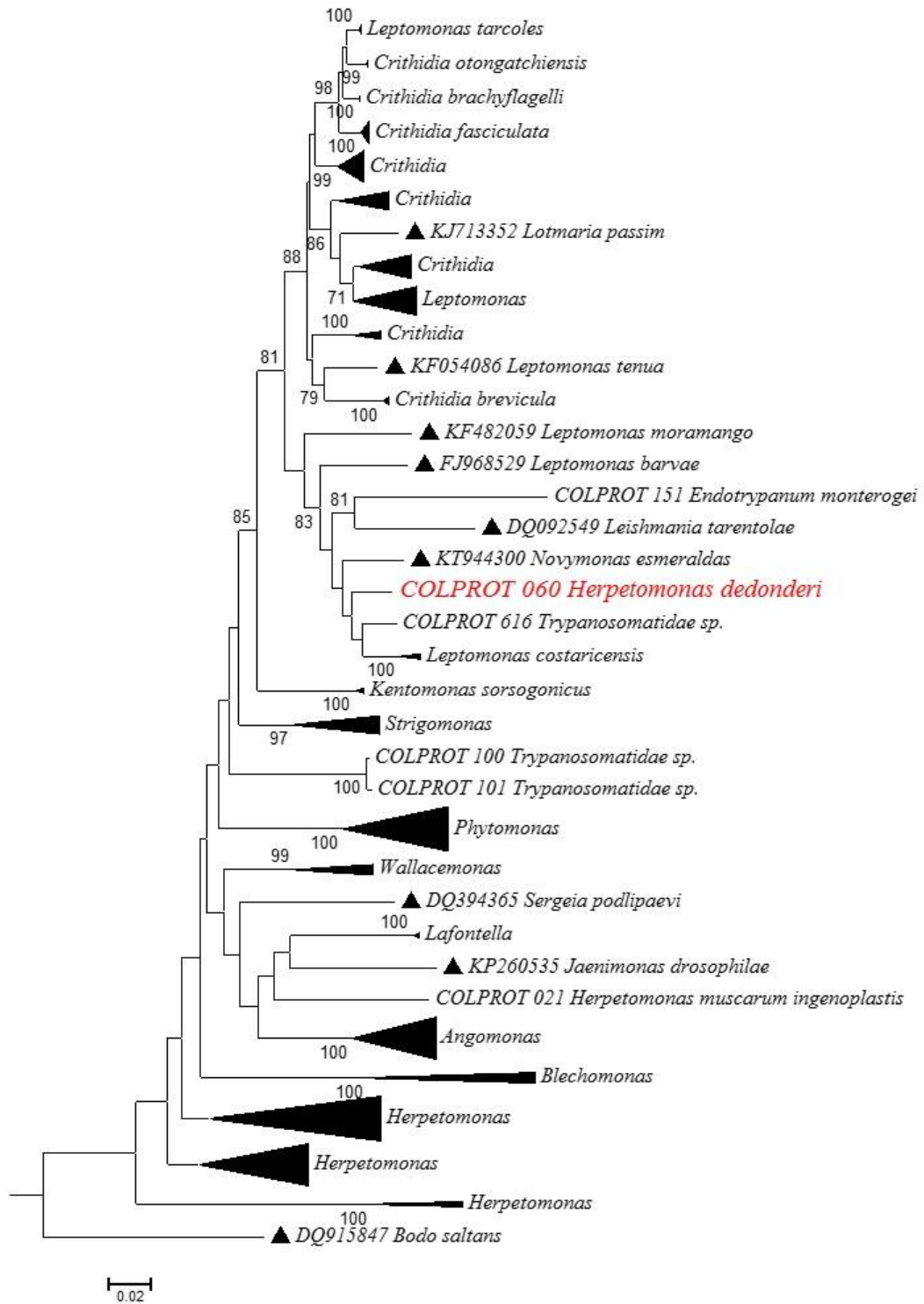


Figura 68- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.

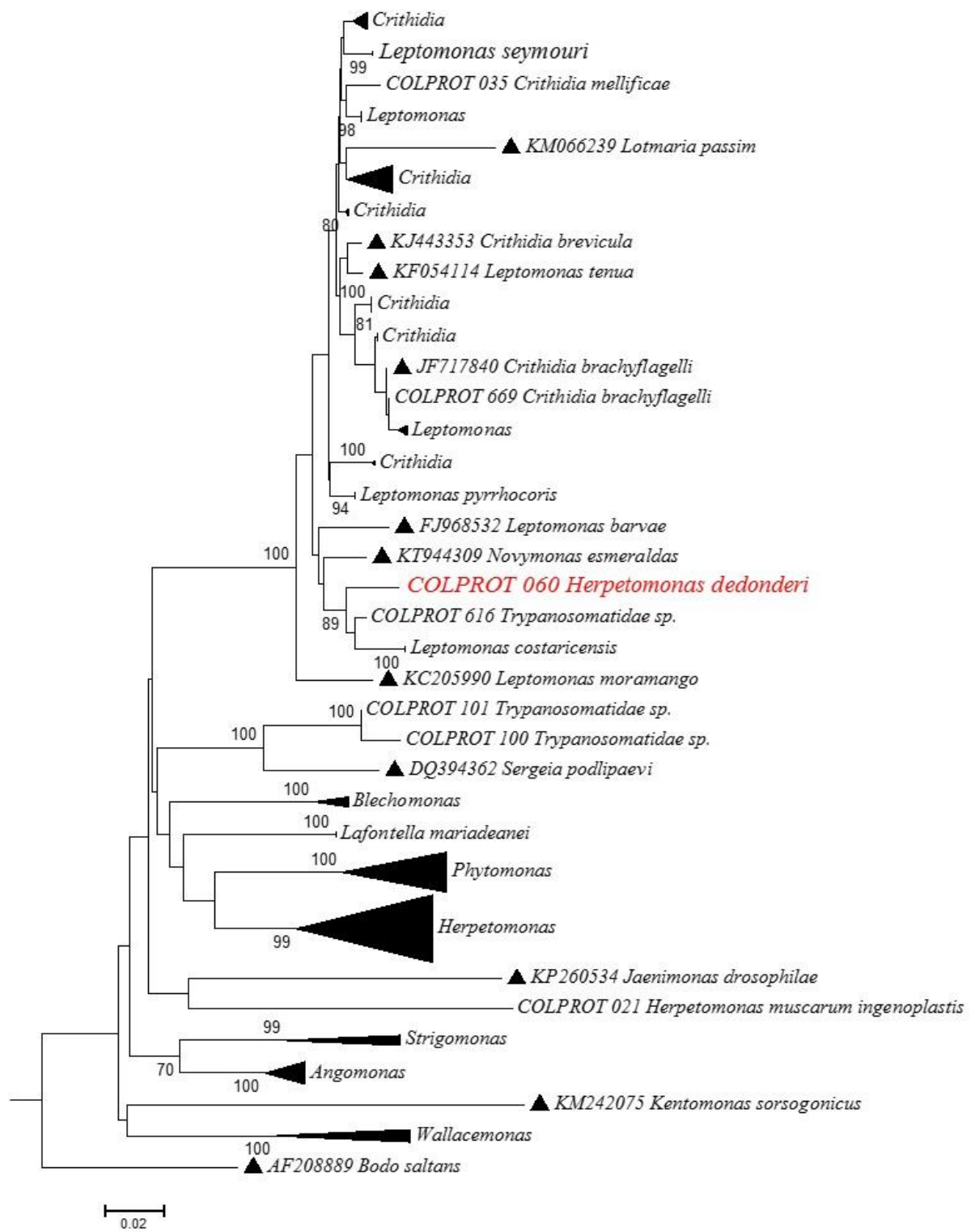


Figura 69- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.

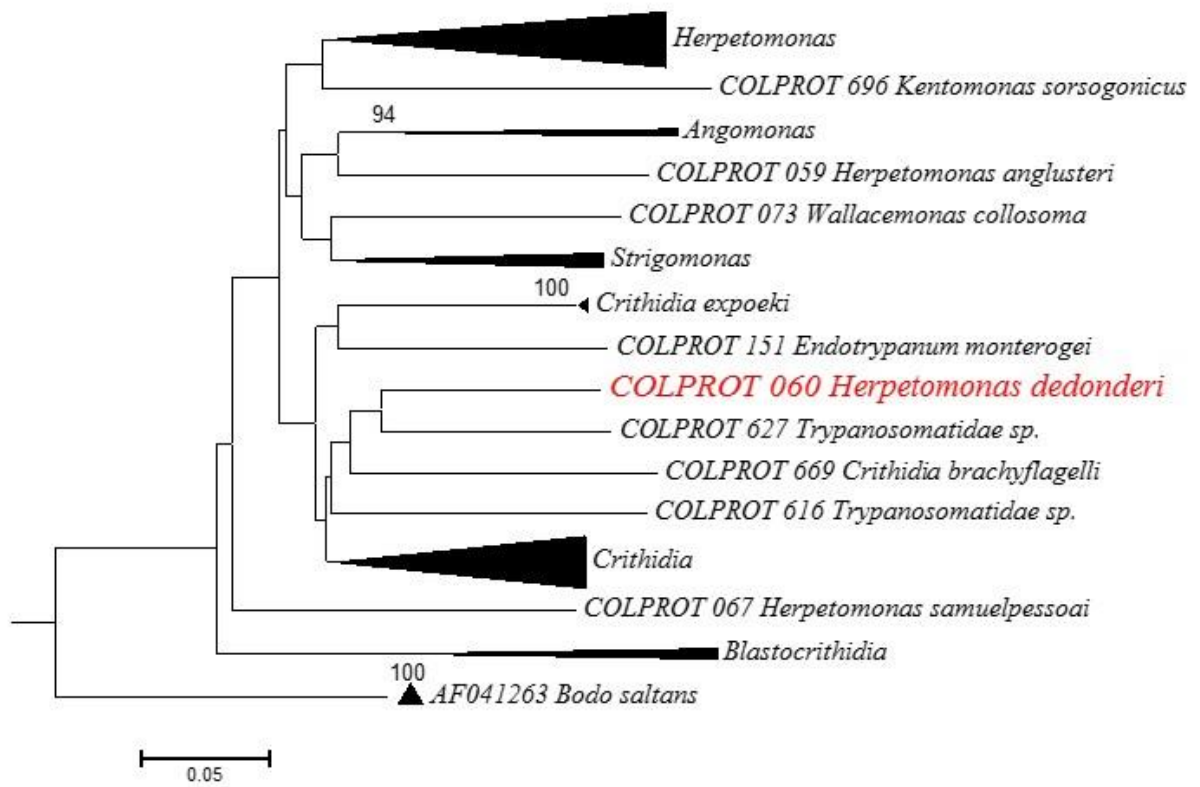


Figura 70- Análise de *Neighbor-joining* para o gene COI. O táxon em vermelho indica o candidato a nova espécie.

Outro grupo (COLPROT 100 e 101) inclui isolados de *Psychodopygus ayrozai* (Diptera), clones dos isolados COLPROT 058 e 099, respectivamente, e representam um clado monofilético. Análises das sequências dos marcadores gGAPDH e SSU (Figuras 8-11, 71 e 72, Anexo I) sugerem que estes organismos sejam classificados em um novo gênero, pois a análise de suas sequências não mostrou identidade com nenhum gênero já descrito. Utilizando a ferramenta Blastn, foi possível buscar por similaridade a identidade deste isolado com sequências já depositadas. O alvo gGAPDH resultou em 89% de identidade com a espécie descrita *L. tenua*, enquanto que o alvo SSU apresentou 92% de identidade com a espécie *Sergeia podlipaev*. Baseado no limiar que observamos para distinção ou sinonímia de espécies, este resultado não sustenta a sinonímia destes depósitos em nenhuma espécie descrita e depositada. Além disso, essa porcentagem também sugere que estes organismos sejam classificados em um novo gênero, pois a análise de suas sequências não mostrou identidade e se mostrou parafilético em relação aos gêneros já descritos. É importante ressaltar que a descrição de novos gêneros necessita de mais análises além das realizadas, incluindo ultraestrutura, comportamento em cultura e em infecção de insetos e características bioquímicas.

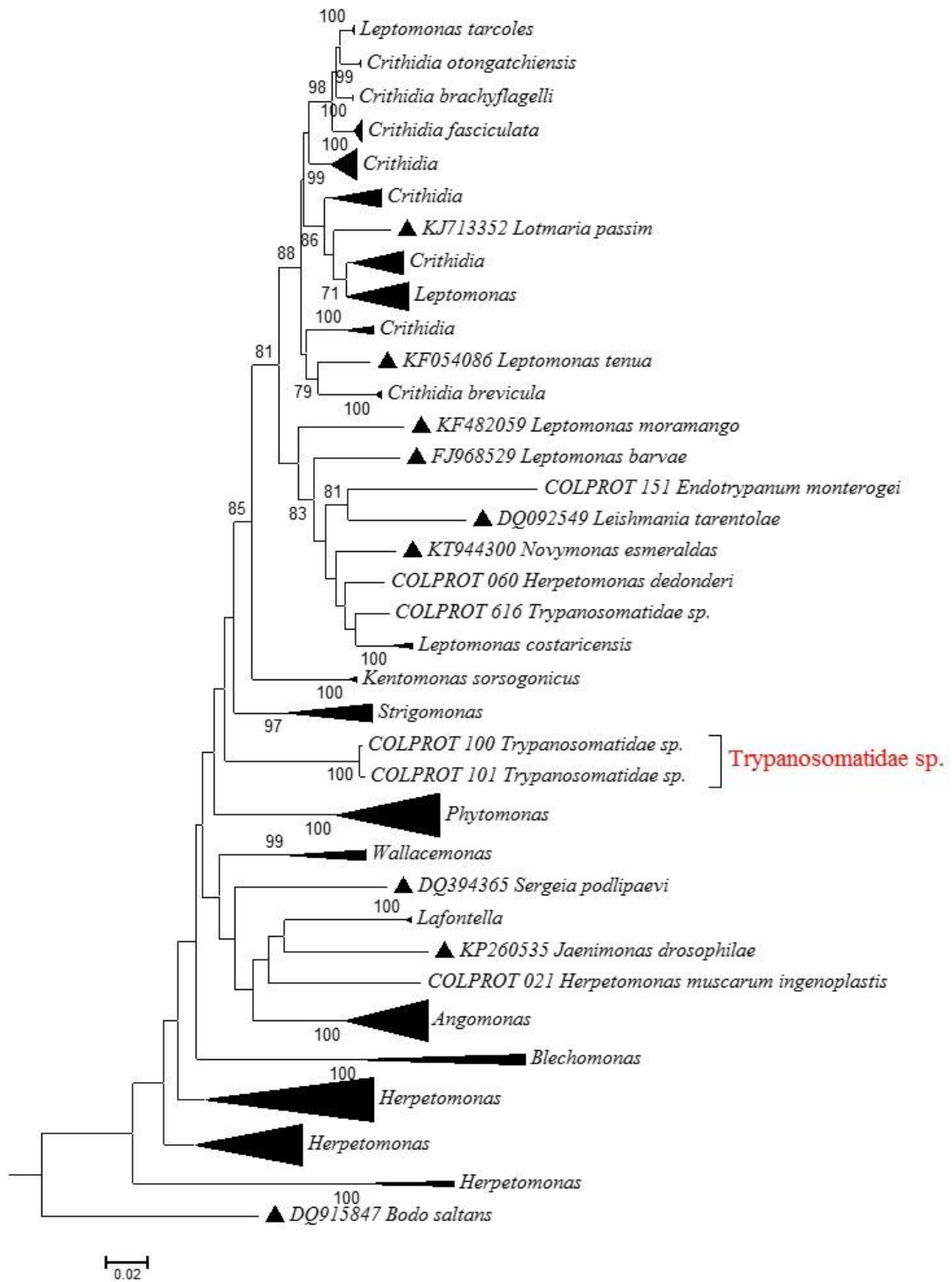


Figura 71- Análise de Neighbor-joining para o gene gGAPDH. O táxon em vermelho indica o candidato a novo gênero.



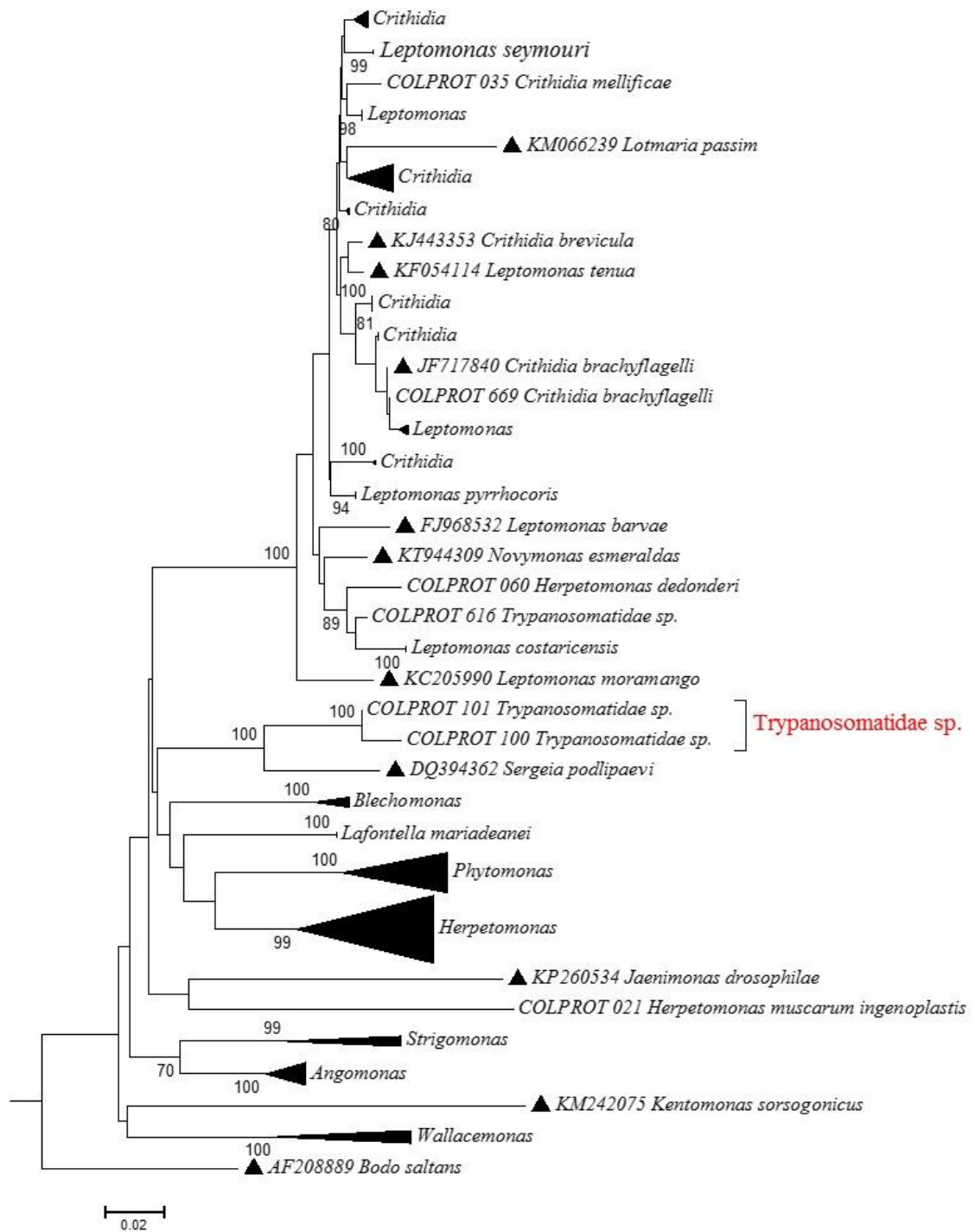


Figura 72- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU. O táxon em vermelho indica o candidato a novo gênero.

Apesar de termos realizado uma análise entre diferentes gêneros com sequências depositadas no GB com a finalidade de encontrar um limiar de divergência genética também entre gêneros (Anexo IV), 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, como as morfológicas. As análises de sequências depositadas no *Genbank* permitiram observar que os pesquisadores que estudam a família Trypanosomatidae consideram que gêneros distintos se sustentam a partir de ~11% de divergência genética.

Como já fora dito anteriormente, não existe um consenso na literatura, entres os pesquisadores que delimitem esta fronteira entre novos gêneros e novas espécies. Um exemplo disso foi a descrição do gênero *Lotmaria* (Schwarz *et al.*, 2015). No trabalho, os autores fazem uma comparação entre um novo isolado coletado de *Apis melífera* (Hymenoptera) com a espécie já amplamente descrita em associação com este inseto, *Crithidia mellificae*. A partir de análises de microscopia, os autores puderam observar formas diferentes das vistas em *C. mellificae*. Além disso, sequências dos genes gGAPDH, SSU, citocromo b e ITS foram analisados. Os resultados observados pelos autores indicam divergência genética variando entre 5-13% para os genes gGAPDH, SSU, citocromo b entre os dois espécimes. No entanto a taxa de divergência para o alvo ITS chegou até 34% e isso foi determinante para a descrição do novo gênero (Schwarz *et al.*, 2015).

A sub-espécie *Herpetomonas muscarum ingenoplastis* foi descrita com base na morfologia e especificidade ao hospedeiro por Roger & Wallace (1971). A amostra foi depositada na ATCC (ATCC 30259) e comprada pela COLPROT (021) em 1994. Não existem outros registros dessa espécie em cultura. Nossos resultados com base nos alvos gGAPDH e SSUrRNA indicam que esta sub-espécie não está associada a nenhum gênero válido pois apresentam valores altos de divergência genética quando suas sequências são comparadas com todas sequências de Tripanosomatidae depositadas no GB (pelo menos 15% para o alvo gGAPDH e 14% para SSU) (Figuras 8-11, 73 e 74, Anexo I). Análises preliminares do gene SSU em comparação com sequências do trabalho de Týč e colaboradores (2013) indicam que *H. muscarum ingenoplastis* formou um clado monofilético a um clado que os autores chamaram de “novo clado 2”, com espécimes isolados de Diptera. No entanto os autores falharam em mater a cultura deste grupo. Sendo assim, *H. muscarum ingenoplastis* (COLPROT 021)

é o único representante em cultura deste clado, sendo possível a descrição do novo gênero, tendo neste depósito a espécie-tipo.

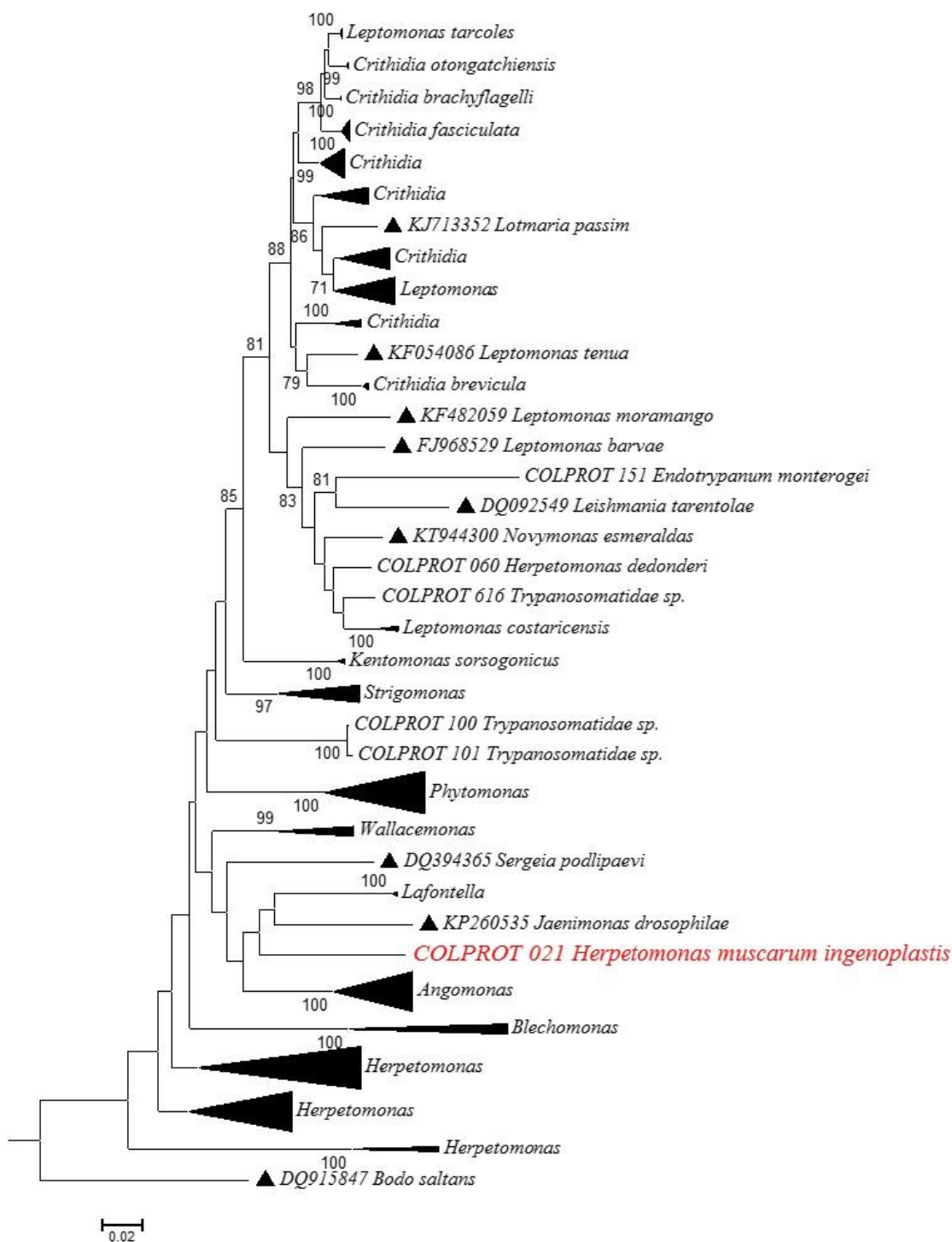


Figura 73- Análise de *Neighbor-joining* para o gene gGAPDH. O táxon em vermelho indica o candidato a novo gênero.

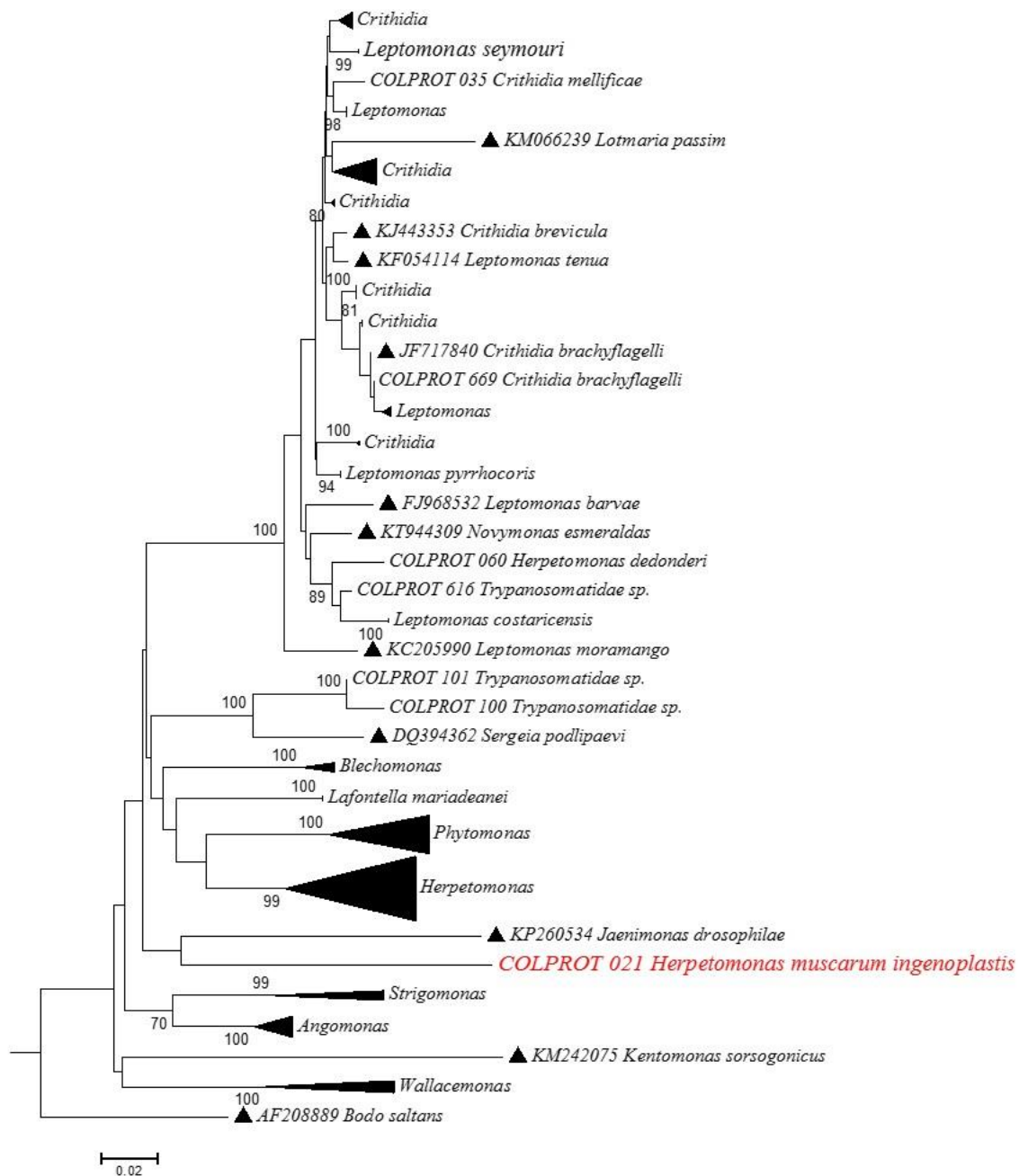


Figura 74- Análise de *Neighbor-joining* para o gene SSU. O táxon em vermelho indica o candidato a novo gênero.

Estudos posteriores serão realizados para caracterizar detalhadamente estes candidatos a novos gêneros, como análise da curva de crescimento, análise dos morfotipos por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura em diversos estágios da curva de crescimento, microscopia eletrônica de transmissão para identificação de estruturas e organelas típicas, e eventual observação de estruturas únicas.

Tabela 11- Compilação dos resultados obtidos durante a curadoria da COLPROT

Trypanosomatídeo*	Nº COLPROT	Código em outras coleções	Depósito		Isolamento		Nº de acesso <i>Genbank</i>			Bibliografia
			Nome da espécie depositada na coleção	Fonte do depósito/ ano de entrada	Hospedeiro/ ordem	Isolado por/ País/ Ano de isolamento	gGAPDH	SSUrRNA	COI	
<i>Herpetomonas muscarum</i>										Rogers & Wallace. 1971. J. Protozool. 18: 645-654.
	013	CT- IOC 013	Trypanosomatidae sp.	R. P. Brazil/ 1994	<i>Pithia picta</i> (Hemiptera)	R. P. Brazil/ Brasil	KX901464	KX901635	KX951593	-
	020	CT- IOC 020 TCC001E ATCC 30260	<i>Herpetomonas muscarum</i>	ATCC/ 1994	<i>Musca domestica</i> (Diptera)	F.G. Wallace & W.E. Rogers / EUA/ 1968	KX901463	KX901632	KX951596	Rogers & Wallace. 1971. J. Protozool. 18: 645-654.
	033	CT- IOC 033 ATCC 30209	<i>Herpetomonas megaseliae</i>	ATCC/ 1994	<i>Megaselia scalaris</i> (Diptera)	J. Janovy/ EUA/ 1972	KX901468	KX901628	KX951599	Daggett. 1972. J. Parasitol. 58: 946-949.
	076	CT- IOC 076 ATCC 30287 TCC048E	<i>Phytomonas davidi</i>	E. Camargo/ 1991	<i>Euphorbia heterophylla</i> (Malpighiales)	R. B. Mcghee/ EUA/ 1975	KX901466	KX901612	KX951613	Mcghee & Postell. 1976. J. Protozool. 23:238-240.
	081	CT- IOC 081	<i>Phytomonas</i> sp.	M. Attias/ 1992	<i>Euphorbia hyssopifolia</i> (Malpighiales)	M. Attias / Brasil/ 1982-1984	KX901469	KX901609	-	Attias & De Souza. 1986. J. Protozool. 33: 84-87
	185	CT- IOC 185	<i>Herpetomonas</i> sp.	R. P. Brazil/ 1996	<i>Nectomys squamipes</i> (Rodentia)	R. P. Brazil	KX901467	KX901601	-	-
	229	CT- IOC 229	<i>Phytomonas serpens</i>	J. E. Fiorini/ 1996	<i>Solanum lycopersicum</i> / Solanales	1986	KX901465	KX901590	KX951625	Fiorini. 1986. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 84:69-74
	276	CT- IOC 276	<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	Manzêlio/ 1997	-	-	- KX901484	KX901586	-	-
<i>Herpetomonas isaaci</i>										Borghesan <i>et al.</i> 2013. Protist. 164:129-152
	682	-	Trypanosomatidae sp.	H. L. C. dos Santos / 2015	<i>Sus domesticus</i> (Artiodactyla)	C. Boucinha/ Brasil/ 2015	KX901471	-	-	

	<b>710</b>	-	Trypanosomatidae sp.	K. A. Morelli/ 2015	<i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera)	K. A. Morelli/ Brasil/ 2015	KX901472	-	-	
	<b>711</b>	-	Trypanosomatidae sp.	K. A. Morelli/ 2015	<i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera)	K. A. Morelli/ Brasil/ 2015	KX901473	KX901562	-	
<hr/>										
<i>Herpetomonas elegans</i>										
	<b>211</b>		Trypanosomatidae sp.	M. Ziccardi/ 1996	Sirfideo	M. Ziccardi/ Brasil/ 1996	KX901470	KX901596	KX951621	Borghesan <i>et al.</i> 2013. Protist. 164:129-152
<hr/>										
<i>Herpetomonas modestus</i>										
	<b>707</b>		Trypanosomatidae sp.	J. Voltýpka e J. Lukeš/ 2015	<i>Cyrtoneuropsis conspersa</i> (Diptera)	J. Voltýpka & J. Lukeš/ Brasil/ 2015	KX901475	KX901563	-	Borghesan <i>et al.</i> 2013. Protist. 164:129-152
<hr/>										
<i>Herpetomonas costoris</i>										
	<b>022</b>	CT-IOC 022 TCC 019E ATCC 30262	<i>Leptomonas costoris</i>	ATCC/ 1994	<i>Gerris comatus</i> (Hemiptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1965	KX901476	-	KX951597	Borghesan <i>et al.</i> 2013. Protist. 164:129-152  Wallace <i>et al.</i> 1965. J. Protozool. 12: 390-393,
<hr/>										
<i>Herpetomonas mirabilis</i>										
	<b>024</b>	CT- IOC 024 TCC 301E ATCC 30263	<i>Leptomonas mirabilis</i>	ATCC/ 1994	<i>Cynomyopsis cadaverina</i> (Diptera)	F. G. Wallace/ Guatemala/ 1963	KX901474	KX901630	-	Wenyon. 1926. Protozoology vol. I. Bailliére, Tindall & Cox, London.  Wallace & Todd. 1964. J Protozool 11:502–505.
<hr/>										
<i>Herpetomonas samueli</i>										
	<b>023</b>	CT- IOC 023 ATCC 30970	<i>Leptomonas lactosovorans</i>	ATCC/ 1994	<i>Zelurus martinsi</i> (Hemiptera)	A. C. Manaia/ Brasil/ 1977	KX901478	-	KX951598	Borghesan <i>et al.</i> 2013. Protist. 164:129-152  Manaia <i>et al.</i> 1981. J. Protozool. 28: 124-126.
	<b>074</b>	CT- IOC 074 TCC 003E ATCC 30971	<i>Leptomonas samueli</i>	L. M. Previato/ 1992	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. L. M. Carvalho/ Brasil/ 1973	KX901477	-	KX951612	Souto-Padrón & De Souza. 1980. Z. Parasitenkd. 62: 127-143.

	<b>288</b>	CT- IOC 288	<i>Leptomonas wallacei</i>	A. Romero/ 1998	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera)	A. Romero/ Brasil	KX901479	-	KX951626	Romero <i>et al.</i> 2000. J. Euk Microbiol 47: 208-220
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>										Carvalho. 1973. Rev Patol Trop 2:223–274.
	<b>059</b>	CT- IOC 059	<i>Herpetomonas anglusteri</i>	M. J. Soares/ 1992	<i>Liopygia ruficornis</i> (Diptera)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1986	KX901482	KX901617	KX951608	Fiorini <i>et al.</i> 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 84:69-74.
	<b>067</b>	CT- IOC 067 TCC 005E ATCC 30252	<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	J. Anguster/ 1991	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. B. Galvão/ Brasil/ 1970	KX901481	KX901614	KX951610	Galvão. 1970. Rev. Goiana Med. 16: 229-236.
	<b>223</b>	CT- IOC 223	Trypanosomatidae sp.	J. E. Fiorini/ 1996	<i>Musca</i> sp. (Diptera)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1996	KX901480	KX901593	-	-
	<b>227</b>	CT- IOC 227	<i>Herpetomonas</i> sp.	J.E Fiorini/ 1989	<i>Phaenicia eximia</i> (Diptera)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1996	KX901483	KX901591	-	Fiorini <i>et al.</i> 1996. Revista da Universidade de Alfenas, 3: 69-76.
<i>Lafontella mariadeanei</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2016. J Eukaryot Microbiol. 63:198-209.
	<b>062</b>	CT- IOC 062 ATCC 30708 TCC004E	<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	A. Romanha/ 1992	<i>Muscina stabulans</i> (Diptera)	N. Yoshida/ Brasil/ 1974	KX901491	KX901615	-	Yoshida <i>et al.</i> 1978. J. Protozool. 25: 421-425.
<i>Strigomonas oncopelti</i>										Teixeira <i>et al.</i> 2011. Protist 162: 503-524
	<b>019</b>	CT- IOC 019 TCC 045E ATCC 12982	<i>Crithidia oncopelti</i> (Apossimbiótica)	ATCC/ 1994	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera)	H. Noguchi/ EUA/ 1926	KX901486	-	KX951595	Chang. 1974. J. Protozool. 21: 699-707.
	<b>055</b>	CT- IOC 055 TCC 043E ATCC 12982	<i>Crithidia oncopelti</i>	Nerad/ 1992	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera)	K. P. Chang/ 1975	KX901485	KX901619	KX951642	Noguchi & Tilden. 1926. J. Exp. Med. 44:307–325.
<i>Strigomonas culicis</i>										Teixeira <i>et al.</i> 2011. Protist 162: 503-524

	<b>034</b>	CT- IOC 034 ATCC 30257	<i>Blastocrithidia culicis</i> (Apossimbiótica)	ATCC 1994	<i>Aedes vexans</i> (Diptera)	F. G. Wallace/ 1975	KX901487	-	-	Chang. 1974. J. Protozool. 21: 699-707.
	<b>041</b>	CT- IOC 041 TCC 012E ATCC 30268	<i>Blastocrithidia culicis</i>	Erney Camargo/ 1991	<i>Aedes vexans</i> (Diptera)	F. G. Wallace/ 1942	KX901488	-	KX951601	Chang. 1974. J. Protozool. 21: 699-707.
<hr/>										
<i>Aangomonas desouzai</i>										
	<b>109</b>	CT- IOC 109 TCC 079E	<i>Crithidia desouzai</i>	E. Camargo/ 1995	<i>Ornidia obesa</i> (Diptera)	Faria e Silva/ Brasil/ 1989	KX901492	KX901604	KX951614	Fioriniet <i>et al.</i> 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 84:69- 74.
	<b>704</b>	-	Trypanosomatidae sp.	J. Voltýpka/ 2015	<i>Cyrtoneuropsis conspersa</i> (Diptera)	J. Voltýpka/ Brasil/ 2015	KX901494	-	-	-
	<b>708</b>	TCC 079E	<i>Angomonas desouzai</i>	V. Yurchenko/ 2015	<i>Ornidia obesa</i> (Diptera)	Faria e Silva/ Brasil/ 1989	KX901493	-	-	-
<hr/>										
<i>Angomonas deanei</i>										
	<b>044</b>	CT- IOC 044 TCC 036E ATCC 30255	<i>Crithidia deanei</i>	E. Camargo/ 1991	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. L. M. Carvalho/ Brasil/ 1973	KX901497	KX901625	-	Carvalho. 1974. J. Protozool. 21:5-8.
	<b>212</b>	CT- IOC 212 TCC 080E	<i>Herpetomonas roitmani</i>	F. e Silva/ 1996	<i>Ornidia obesa</i> (Diptera)	Faria e Silva/ Brasil/ 1986	KX901496	KX901595	-	Faria e Silva <i>et al.</i> 1991 J. Protozool 38: 489-494.
	<b>226</b>	CT- IOC 226	Trypanosomatidae sp.	J. E. Fiorini/ 1994	<i>Morus</i> sp. (Rosales)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1994	KX901499	KX901592	-	-
	<b>698</b>	TCC 036E	<i>Angomonas deanei</i>	E. Camargo/ 2015	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. L. M. Carvalho/ Brasil/ 1973	KX901498	-	-	Carvalho. 1974. J. Protozool. 21:5-8
<hr/>										
<i>Angomonas ambiguus</i>										
	<b>702</b>	TCC 1780	<i>Angomonas ambiguus</i>	E. Camargo/ 2015	<i>Chrysomya albiceps</i>	Brasil	KX901495	KX901566	-	Teixeira <i>et al.</i> 2011. Protist 162: 503-524



## (Diptera)

<i>Wallacemonas collosoma</i>									Wallace. 1960. J. Protozool. 7: 390-393.
<b>073</b>	CT- IOC 073 ATCC 30261	<i>Leptomonas collosoma</i>	E. Camargo/ 1991	<i>Gerris dissortis</i> (Hemiptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1960	KX901489	KX901613	KX951611	Kostygov <i>et al.</i> 2014. Protist. 165:594–604.
<i>Phytomonas nordicus</i>									Frolov <i>et al.</i> 2016. Eur J Protistol. 52:1-10.
<b>079</b>	CT- IOC 079	<i>Phytomonas</i> sp.	M. Teixeira/ 1992	<i>Allamanda cathartica</i> (Gentianales)	Kastelein & Passadi/ Suriname/ 1984	KX901502	KX901611	-	Kastelein & Parsadi. 1984. De Surinaamse Landbouw 32 (3): 85 – 89/ Kastelein & Parsadi. 1988. J Protzool. 35:533-536.
<i>Phytomonas françai</i>									Aragão. 1927. Comptes Rendus des SPances de la SociPtC de Biologie 97:1077-1080.
<b>011</b>	CT- IOC 011	<i>Phytomonas françai</i>	M. Attias/ 1994	<i>Manihot esculenta</i> (Malpighiales)	I. Roitman/ Brasil/ 1986	KX901504	KX901636	-	Vainstein & Roitman. 1986. Protozool 33:511-513.
<b>082</b>	CT- IOC 082	<i>Phytomonas</i> sp.	M. Teixeira/ 1994	<i>Euphorbia pinea</i> (Malpighiales)	-	KX901503	KX901608	-	Dollet. 1982. C. R. Acad. Sci. Paris Série III. 295: 547- 550.
<i>Phytomonas serpens</i>									Gibbs. 1957. Journal of Parasitology 47: 297-303. / Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-271
<b>080</b>	CT- IOC 080	<i>Phytomonas</i> sp.	M. Teixeira/ 1992	<i>Citrus bergamia</i> (Sapindales)	Brasil/ 1989	KX901505	KX901610	-	Conchon <i>et al.</i> 1989. Protozool. 36:412-414.
<b>083</b>	CT- IOC 083	<i>Phytomonas</i> sp.	M. Teixeira/ 1994	<i>Jathropha macrantha</i> (Malpighiales)		KX901508	KX901607	-	Burstein. & Romero. 1956. Arch Pathol Clin 10:1-11.
<b>161</b>	CT- IOC 161	<i>Herpetomonas macgheei</i>	A. Romero/ 1996	<i>Leptoglossus zonatu</i>	J. V. Jankevicius/	KX901509	KX901603	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1993. J. Euk. Microbiol. 40: 576-581.

				(Hemiptera)	Brasil/ 1993				
<b>174</b>	CT- IOC 174	<i>Phytomonas serpens</i>	V. Jankevicius/ 1996	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Solanales)	J. V. Jankevicius/ Brasil	KX901510	KX901602	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
<b>186</b>	CT- IOC 186	<i>Phytomonas serpens</i>	V. Jankevicius/ 1996	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanales)	S. I. jankevicius/ Brasil	KX901511	KX901600	KX951620	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
<b>187</b>	CT- IOC 187 Isolate 30T	<i>Phytomonas</i> sp.	JV. Jankevicius/ 1996	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanales)	S. I. jankevicius/ Brasil	KX901512	KX901599	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
<b>188</b>	CT- IOC 188	<i>Phytomonas</i> sp.	V. Jankevicius/ 1996	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Solanales)	S. I. jankevicius/ Brasil	KX901513	KX901598	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
<b>189</b>	CT- IOC 189 Isolate 9T	<i>Phytomonas serpens</i>	V. Jankevicius/ 1996	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Solanales)	J. V. Jankevicius/ Brasil	KX901514	KX901597	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
<b>245</b>	CT- IOC 245	Trypanosomatidae sp.	J. E. Fiorini/ 1997	<i>Phthia picta</i> (Hemiptera)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1997	KX901506	KX901589	-	-
<b>247</b>	CT- IOC 247	Trypanosomatidae sp.	J. E. Fiorini/ 1997	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanales)	J. E. Fiorini/ Brasil/ 1997	KX901507	KX901588	-	-
<b>675</b>		<i>Phytomonas serpens</i>	V. Yurchenko/ 2014	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Solanales)	J. V. Jankevicius/ Brasil	KX901515	KX901574	-	Jankevicius <i>et al.</i> 1989. Journal of Protozoology 36:265-27 1.
		<i>Kentomonas sorsogonicus</i>							Votýpka <i>et al.</i> 2014. J. Protist. 165:825–838
<b>696</b>		<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	V. Yurchenko/ 2015	<i>Sarcophaga</i> sp. (Diptera)	J. Voltýpka & J. Lukeš/ Filipinas/ 2014	KX901516	-	KX951641	

*Leptomonas  
costaricensis*

Yurchenko *et al.* 2006.  
Parasitology 133:537-546

	627	CEU 120	Trypanosomatidae sp.	P. Grellier/ 2013	<i>Ploeogaster</i> ( <i>Aricosus</i> ) sp. (Hemiptera)	D. Blanchet/ Guiana /2004	KX901518	KX901582	KX951631	
<i>Leptomonas jaderae</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:893–909.
	674	ATCC PRA- 264	<i>Leptomonas jaderae</i>	V. Yurchenko/ 2015	<i>Jadera obscura</i> (Hemiptera)	J. Lukeš/ Costa Rica/ 2009	KX901521	KX901575	-	
<i>Leptomonas seymouri</i>										Wallace. 1977. J Protozool. 24:483-484.
	277	CT-IOC 277 ATCC 30220	<i>Leptomonas seymouri</i>	A. Romanha/ 1997	<i>Dysdercus suturellus</i> (Hemiptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1959	KX901523	-	-	
	705	-	Trypanosomatidae sp.	J. Voltýpka/ 2015	<i>Dysdercus ruficollis</i> (Hemiptera)	J. Voltýpka/ Brasil/ 2015	KX901522	KX901565	-	
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>										Zotta. 1921. Comptes Rendus de Seances de la Societe de Biologie 84:822– 824.
	026	CT- IOC 026 ATCC 30974	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	ATCC/ 1994	<i>Pyrrhocoris apterus</i> (Hemiptera)	F. G. Wallace/ República Checa/ 1978	KX901526	KX901629	-	
	572	CT- IOC 572	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	B.N. dos Santos/ 2005	<i>Dysdercus</i> sp. (Hemiptera)	B.N. dos Santos/ Brasil/ 2005	KX901525	-	-	
	706	-	Trypanosomatidae sp.	J. Voltýpka/ 2015	<i>Dysdercus ruficollis</i> (Hemiptera)	J. Voltýpka/ Brasil/ 2015	KX901524	KX901564	-	
<i>Crithidia bombi</i>										Lipa & Triggiani. 1988. Acta Protozool., 27:287–290.
	678	-	<i>Crithidia bombi</i>	R. Schmid- Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid- Hempel/ Suíça/ 2008	KX901528	KX901571	-	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.

										Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<b>683</b>	-		<i>Crithidia bombi</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ EUA/ 2008	KX901529	KX901570	-	
<b>684</b>	-		<i>Crithidia bombi</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ Suiça/ 2008	KX901527	KX901569	-	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<hr/>										
<i>Crithidia expoeki</i>										
<b>679</b>	-		<i>Crithidia expoeki</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ Suiça/ 2008	KX901530	-	KX951635	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<b>685</b>	-		<i>Crithidia expoeki</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ EUA/ 2008	KX901531	-	KX951636	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<b>686</b>	-		<i>Crithidia expoeki</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ Suiça/ 2008	KX901532	KX901568	KX951637	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<b>687</b>	-		<i>Crithidia expoeki</i>	R. Schmid-Hempel/ 2015	<i>Bombus lucorum</i> (Hymenoptera)	R. Schmid-Hempel/ EUA/ 2008	KX901533	KX901567	KX951638	Schmid-Hempel & Tognazzo. 2010. J Eukaryot Microbiol. 57:337-345.
<hr/>										
<i>Crithidia flexonema</i>										
<b>016</b>	CT-IOC 016 ATCC 50211		<i>Crithidia flexonema</i>	ATCC/ 1994	<i>Gerris remiges</i> (Hemiptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1960	KX901534	KX901634		Wallace. 1960. J. Protozool. 7:390-393, Wallace. 1960. J. Protozool. 7:390-393,
<b>042</b>	CT- IOC 042 ATCC 30251		<i>Crithidia acanthocephali</i>	E. Camargo/ 1991	<i>Acanthocephala femorata</i> (Hemiptera)	R. B. Mcghee/ EUA/ 1959	KX901535	KX901626	--	Hanson. & Mcghee. 1961. J. Protozool. 8:200-204.
<b>254</b>	CT- IOC 254		<i>Crithidia</i> sp.	-	<i>Zelus</i> sp. (Hemiptera)	-	KX901536	KX901587	-	
<hr/>										
<i>Crithidia abscondita</i>										
Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59:893-909.										

	<b>677</b>	ATCC PRA-262	<i>Crithidia abscondita</i>	V. Yurchenko/2014	<i>Largus</i> sp. (Hemiptera)	V. Yurchenko Ecuador/ 2009	KX901538	KX901572	-	Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59:893-909.
<i>Crithidia brevicula</i>										Kotysgov <i>et al.</i> 2014. Protist. 165:594-604.
	<b>110</b>	CT- IOC 110 TCC 093	<i>Wallaceina brevicula</i>	E. Camargo/1995	<i>Nabis brevis</i> (Hemiptera)	A. O. Frolov & M. N. Malycheva/ Russia/ 1986	KX901539	-	-	
	<b>111</b>	CT- IOC 111 TCC 091	<i>Wallaceina inconstans</i>	E. Camargo/1995	<i>Calocoris sexguttatus</i> (Hemiptera)	S. A. Podlipev/ Russia/ 1986	KX901540	-	KX951615	Podlpaev. 1990. Parazitologiya 24:339-345.
<i>Crithidia permixta</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59:893-909.
	<b>671</b>	ATCC PRA-261	<i>Crithidia permixta</i>	V. Yurchenko/2014	<i>Mirini</i> sp. (Hemiptera)	V. Yurchenko/ Ecuador/ 2009	KX901541	KX901578	-	Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59:893-909.
<i>Crithidia luciliae thermophila</i>										Roitman <i>et al.</i> 1977. J. Protozool. 24: 553-556.
	<b>018</b>	CT-IOC 018 ATCC 30818	<i>Crithidia hutneri</i>	ATCC/ 1994	<i>Coscomoclopiis</i> sp. (Hemiptera)	I. Roitman/ Brasil/ 1975	KX901548	KX901633	KX951594	Roitman <i>et al.</i> 1977. J. Protozool. 24: 553-556.
	<b>054</b>	CT-IOC 054 ATCC 30817	<i>Crithidia luciliae thermophila</i>	E. Camargo/1991	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. L. M. Carvalho/ Brasil/ 1973	KX901547	KX901620	KX951606	Roitman <i>et al.</i> 1977. J. Protozool. 24: 553-556.
	<b>056</b>	CT-IOC 056	<i>Crithidia</i> sp.	M. Deanei/1991	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	N. Thomas/ Brasil/ 1991	KX901546	KX901618	KX951607	Sá-Xavier <i>et al.</i> 1998. Mem. Inst. Oswaldo cruz 93 (Suppl II):95
	<b>676</b>	ATCC PRA-346	<i>Crithidia confusa</i>	V. Yurchenko/2014	<i>Largus maculatus</i> (Hemiptera)	M. Jirků Costa Rica/ 2009	KX901543	KX901573	KX951634	Jirků <i>et al.</i> 2012. Eukaryot. Microbiol., 59:537–547.
	<b>688</b>	ATCC 30818	<i>Crithidia hutneri</i>	ATCC/ 2015	<i>Coscomoclopiis</i> sp. (Hemiptera)	I. Roitman/ Brasil/, 1975	KX901545	-	KX951639	Roitman <i>et al.</i> 1977. J. Protozool. 24: 553-556.

	<b>689</b>	ATCC 30817	<i>Crithidia luciliae thermophila</i>	ATCC/ 2015	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera)	A. L. M. Carvalho/ Brasil/ 1977	KX901544	-	KX951640	Roitman. 1977. J. Protozool. 24: 553-556.
	<b>703</b>	-	Trypanosomatidae sp.	J. Voltypka/ 2015	Miridae (Hemiptera)	J Voltypka/ Brasil/ 2015	KX901542	-	-	-
<hr/>										
<i>Crithidia insperata</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2009. Int J Syst Evol Microbiol. 59:893-909
	<b>670</b>	ATCC PRA-263	<i>Crithidia insperata</i>	V. Yurchenko/ 2014	<i>Leptopetalops</i> sp. (Hemiptera)	V. Yurchenko/ Equador/ 2009	KX901549	KX901579	-	
<hr/>										
<i>Crithidia otongatchiensis</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2014. Folia Parasitologica 61: 97–112.
	<b>628</b>	CEU 119	Trypanosomatidae sp.	P. Grellier/ 2013	<i>Plolgaster</i> sp. (Hemiptera)	D. Blanchet Guiana/ 2004	KX901551	KX901581	-	-
	<b>673</b>	-	<i>Crithidia otongatchiensis</i>	V. Yurchenko/ 2014	<i>Eristalis</i> sp. (Diptera)	V. Yurchenko/ Equador/ 2008	KX901550	KX901576	-	Yurchenko <i>et al.</i> 2014. Folia Parasitologica 61: 97–112.
<hr/>										
<i>Crithidia brachyflagelli</i>										Jirků <i>et al.</i> 2012. Eukaryot. Microbiol., 59:537–547
	<b>669</b>	ATCC PRA-345	<i>Crithidia brachyflagelli</i>	V. Yurchenko/ 2014	<i>Prepos accinctus</i> (Hemiptera)	M. Jirků / Costa Rica/ 2009	KX901553	KX901580	KX951633	Jirků <i>et al.</i> 2012. Eukaryot. Microbiol., 59:537–547
<hr/>										
<i>Crithidia mellificae</i>										Langridge. 1967. J. Protozool. 14: 485-487.
	<b>035</b>	CT- IOC- 035 ATCC 30254	<i>Crithidia mellificae</i>	1994	<i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera)	RB McGhee/ EUA/ 1974	KX901537	KX901627	KX951600	
<hr/>										
<i>Leptomonas tarcoles</i>										Yurchenko <i>et al.</i> 2008. Protist. 159:99—114.
	<b>672</b>	ATCC PRA-241	<i>Leptomonas tarcoles</i>	V. Yurchenko/ 2014	<i>Prepops</i> sp. (Hemiptera)	V. Yurchenko/ Costa Rica/ 2008	KX901552	KX901577	-	Yurchenko <i>et al.</i> 2008. Protist. 159:99—114.
<hr/>										

<i>Crithidia fasciculata</i>									Léger. 1902. Compte Rendu Des Seances De La Societe De Biologie 54:354-356.
<b>048</b>	CT-IOC 048 ATCC 11745	<i>Crithidia fasciculata</i>	Nerad/ 1992	<i>Anopheles quadrimaculatus</i> (Diptera)	H. Noguchi & E. B. Tilden/ 1926	KX901558	KX901624	KX951602	Wallace. 1943. The Journal of Parasitology. 29: 196-205.
<b>050</b>	CT-IOC 050 ATCC 12857	<i>Crithidia fasciculata</i>	Nerad/ 1992	<i>Culex pipiens</i> (Diptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1942	KX901559	KX901623	KX951603	Wallace. 1943. The Journal of Parasitology. 29: 196-205.
<b>051</b>	CT-IOC 051	<i>Crithidia guilhermei</i>	J. Anguster/ 1993	<i>Lucilia cuprina</i> (Diptera)	R. P. Brazil/ Brasil/ 1984	KX901557	KX901622	KX951604	Soares. 1986. Can. J. Zool. 64: 2837-2842
<b>053</b>	CT-IOC 053 ATCC 30258	<i>Crithidia luciliae</i>	E. Camargo/ 1992	<i>Phaenicia sericata</i> (Diptera)	EUA/ 1958	KX901560	KX901621	KX951605	Wallace & Clark. 1959. J. Protozool. 6: 50-61.
<b>184</b>	CT- IOC 184	<i>Crithidia ricardoii</i>	R. L. de Oliveira/ 1996	<i>Culex saltanensis</i> (Diptera)	A. Sibajev/ Brasil/ 1928	KX901556	-	KX951619	Sibajev. 1993. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88:541-545.
<b>213</b>	CT- IOC- 213	Trypanosomatidae sp.	A. Romero/ 1996	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (Malpighiales)	A. Romero/ Brasil/ 1994	KX901554	KX901594	KX951622	-
<b>606</b>	-	<i>Crithidia</i> sp.	A. A. Brandão/ 2011	<i>Homo sapiens</i> (Primates)	E. Martinez/ Peru/ 1994	KX901555	KX901584	KX951629	-
<hr/>									
<i>Leptomonas</i> sp.									
<b>344</b>	CT- IOC- 344	<i>Leptomonas</i> sp.	A. C. Manaia/ 1999	<i>Leptocoris trivittatus</i> (Hemiptera)	A. C. Manaia/ Brasil/ 1999	KX901520	KX901585	-	Manaia <i>et al.</i> . 1995. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90 Suppl. I: 260.
<hr/>									
<i>Leptomonas</i> sp.									-
<b>616</b>	CEU 334	Trypanosomatidae sp.	P. Grellier/ 2013	<i>Rasahus surinamensis</i> (Hemiptera)	D. Blanchet/ Guiana/ 2003	KX901517	KX901583	KX951630	-
<hr/>									
Trypanosomatidae sp.									
<b>060</b>	CT- IOC- 060	<i>Herpetomnas dedonderi</i>	E. Camargo/ 1992	<i>Haemagogus janthinomys</i> (Diptera)	1991/ Guiana Francesa	KX901519	KX901616	KX951609	Dedet. 1921. Journal of Eukaryotic Microbiology 33:530-533

Trypanosomatidae sp.

Rogers & Wallace. 1971. J. Protozool. 18: 645-649.

---

<b>021</b>	CT- IOC 021 ATCC 30259	<i>Herpetomonas musc arum</i> subsp. <i>ingenopl astis</i>	ATCC/ 1994	<i>Phormia regina</i> (Diptera)	F. G. Wallace/ EUA/ 1968	KX901490	KX901631	-	-
------------	---------------------------	--	------------	------------------------------------	-----------------------------	----------	----------	---	---

---

Trypanosomatidae sp.

<b>101</b>	CT- IOC 101	Trypanosomatidae sp.	W. Degraeve/ 1994	<i>Psychodopygus ayrozai</i> (Diptera)	T. Barret/ Brasil/ 1993	KX901501	KX901605	-	-
<b>100</b>	CT- IOC 100	Trypanosomatidae sp.	W. Degraeve/ 1994	<i>Psychodopygus ayrozai</i> (Diptera)	T. Barret/ Brasil/ 1993	KX901500	KX901606	-	-

---

\*Espécie descrita a partir dos resultados das análises dos marcadores moleculares apresentados neste trabalho.



## V. CONCLUSÕES

- ✓ A análise das sequências depositadas no Genbank dos principais marcadores utilizados na literatura permitiu observar um limiar padrão de divergência genética suficiente para separar espécies e gêneros: pelo menos 2% de divergência genética para o alvo molecular SSUrRNA e mais de 4% para o alvo gGAPDH.
- ✓ Através da utilização de alvos moleculares, aliados a ferramentas de bioinformática, foi possível realizar a curadoria da COLPROT dos organismos selecionados neste trabalho. Como curadoria foi possível: confirmar a identidade taxonômica dos depósitos, identificar a taxonomia dos isolados depositados sem identificação prévia, identificar depósitos que são passíveis de reclassificação taxonômica e depósitos que não agrupam com nenhum outro gênero ou espécie conhecidos e, portanto, são candidatos a novos gêneros/ espécies.
- ✓ Análises de NJ e ML foram congruentes para a maioria das espécies nos três marcadores analisados. As incongruências, no entanto, foram resolvidas após revisão da confiabilidade dos clados (valores de *bootstrap*).
- ✓ O alvo COI foi capaz de discriminar em uma grande diversidade de espécies e gêneros de tripanossomatídeos, confirmando a aplicabilidade deste gene como *barcode* de tripanossomatídeos.
- ✓ O resgate histórico permitiu a atualização e sistematização do banco de dados interno (Sicol), bem como a atualização e disponibilização do acervo no banco de dados público da coleção (<http://colprot.fiocruz.br/>).

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja K**, Arora G, Khare P, Selvapandiyan A. 2015. Selective elimination of *Leptomonas* from the in vitro co-culture with *Leishmania*. *Parasitol Int.* 64:1-5.
- Aragão HB**. 1927. Sur un flagellk du latex de *Manihot palmata*, *Phytomonas francai* n. sp. *Comptes Rendus des SPances de la SociPtC de Biologie.* 97: 1077- 1080.
- Aragão HB**. 1931. Pesquisas sobre *Phytomonas* França. *Ver Biol Hig.* 2: 185-189.
- Begerow D**, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 99-108.
- Boisseau-Garsaud AM**, Cales-Quist D, Desbois N, Jouannelle J, Jouannelle A, Pratlong F, Dedet JP. 2000. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:51–52.
- 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.
- Brandao AA**, Miranda A, Degraive WM, Sousa MA. 2000. The heterogeneity of choanomastigotes shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Res.* 86:809-812.
- Bueno-Silva M**. 2012. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. *Estud. Biol., Ambiente Divers.* 34:157- 163.
- Camargo EP**, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. 1978. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp. Parasitol.* 46:141–144.
- Camargo EP**, Mattei DM, Barbieri CL, Morel CM. 1982. Electrophoretic analysis of endonuclease generated fragments of kDNA, of esterase isoenzymes and surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. *J Protozool.* 29:251-258.
- 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**, Silva S, Roitman I, De Souza W, Jankevicius, JV, Dollet M. 1987. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 34:439–441.
- Camargo EP**. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29-110.
- Campbell DD**, Kubo K, Clark CG, Boothroyd JC. 1987. Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 196: 113-124.
- Carnes J**, Anupama A, Balmer O, Jackson A, Lewis M, Brown R, Cestari I, Desquesnes M, Gendrin C, Gibson W, Hertz-Fowler C, Imamura H, Ivens A, Jansen A, Kořený L, Lai D-H, MacLeod A, Martin D, McDermott SM, Merritt C, Monnerat S, Moon W, Myler P, Phan I, Ramasamy G, Sivam D, Lun Z-R, Lukeš J, Stuart K, Schnauffer A. 2015. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3404
- Carvalho ALM** .1973. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Patol Trop* 2:223–274
- Carvalho SD**, Perez-Morga D, Traub-Cseko YM. 1993. Characterization of kinetoplast DNA from *Phytomonas serpens*. *J Eucaryot. Microbiol.* 40: 317-322.
- Cavalier-Smith T**. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14: 461-481.
- Cavalier-Smith T**. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews Cambridge.* 73:203-266.
- Cavalier-Smith T**. 2004. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 271: 1251-1262.
- Cerisola JA**, Rohwedder R, Bozzini JP, Del Prado CE. 1971. *Blastocrithidia triatomae* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *J Protozool.* 18: 503-506.
- Chang KP**. 1975. Haematophagous insect and haemoflagellate as hosts for prokaryotic endosymbionts. *Symp Soc Exp Biol.* 29:407-428
- Chicharro C**, Alvar J. 2003. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97:75–78.
- Clark CG**. 1997. Riboprinting: A Tool for the Study of Genetic Diversity in Microorganisms. *J. Euk. Microbid.* 44: 277-283.

- Conchon I, Campaner M, Sbravate C, Camargo EP.** 1989. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp. isolated and cul-tured from fruit. *J Protozool* 36:412–414
- 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.
- 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, Santos LO, Marinho FA, Dias FA, Lopes AHCS, Santos ALS, Branquinha MH.** 2006. Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role on the insect interaction *Curr. Microbiol.* 52: 439-444.
- 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, Yurchenko V, Votýpka J, Grellier P.** 2016. Protist collections: Essentiality for future research. *Trends Parasitol.* Aceito.
- 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.
- 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.
- de Sá MFG, de Sá CM, Veronese MA, Filho AS, Gander ES.** 1980. Morphologic and Biochemical Characterization of *Crithidia brasiliensis* sp. n. *J. Prorozool.* 27: 253–257.
- Dedet JP, Geoffroy B, Benichou JC.** 1986. *Herpetomonas dedonderi* N. Sp. (Sarcocystidophora, Trypanosomatidae) from *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 (Diptera, Culicidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 33: 530-533.
- Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Heurre M.** 1995. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatids in a patient infected with HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 644-646.
- Dedet JP, Pratlong F.** 2000. Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J Eukaryot Microbiol.* 47:37-39.
- Deschamps P, Lara E, Marande W, Lopez-Garcia P, Ekelund F, Moreira D.** 2011. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol.* 28:53-58.
- Dietrich P, Soares MB, Affonso MH, Floeter-Winter LM.** 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene.* 125:103-107. diversity in marine environments. *PLoS ONE* 5: e13991.
- Dollet M.** 1984. Plant Diseases Caused by Flagellate Protozoa (*Phytomonas*). *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 115-132.
- Dollet M, Sturm NR, Campbell DA.** 2012. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups. *Infect Genet Evol.* 12:299-308.
- Donovan C.** 1909. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). *Lancet.* 177:1495-1496.
- 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.* 9:29.
- Faria e Silva PM, Sole-Cava AM, Soares MJ, Motta MC, Fiorini JE, de Souza W.** 1991. *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989) n. comb.: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm. *J Protozool.* 38:489-494.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, Campbell DA.** 1997. Miniexon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44:535–539.

- Ferreira MS**, Borges AS. 2002. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:443-457.
- 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.
- Fiorini JE**, Silva PMF, Soares MJ, Brazil RP. 1989. Três novas espécies de tripanosomatídeos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 84:69-74.
- Fiorini JO**, Atilde OE, Takata CSA, Teofilo VM, Nascimento LC, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, Teixeira MMG, De Souza W. 2001. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpeessoai camargoi* n. subsp., a Trypanosomatid Isolated from the Flower of the Squash *Cucurbita moschata*. *J Eukaryot Microbiol* 48:62-69.
- 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.
- Fothergill-Gilmore LA**, Michels PAM. 1993. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* 59: 105-235.
- Frolov AO**, Malysheva MN, Yurchenko V, Kostygov AY. 2016. Back to monoxeny: *Phytomonas nordicus* descended from dixenous plant parasites. *Eur J Protistol.* 52:1-10.
- Ghosh S**, Banerjee P, Sarkar A, Datta S, Chatterjee M. 2012. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 50:2774-2778.
- Gibbs AJ.** 1957. *Leptomonas serpens* n sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. *J. Parasitol.* 47: 297-303.
- Gill JW**, Vogel HJ. 1963. A Bacterial Endosymbiote in *Crithidia* (*Strigomonas*) *oncopelti*: Biochemical and Morphological Aspects. *J. Protozool.* 10:148-152.
- Guilbride DL, Englund PT.** 1998. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. *J Cell Sci.* 111:675-9.
- 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**, 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.
- 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. 2005a. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int. J. Parasitol.* 35: 431-443.
- Hamilton PB**, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. 2005b. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol. Ecol.* 14: 3167-3175.
- Hamilton PT**, Votýpka J, Dostálová A, Yurchenko V, Bird NH, Lukeš J, Lemaitre B, Perlman SJ. 2015. Infection Dynamics and Immune Response in a Newly Described *Drosophila*-Trypanosomatid Association. *MBio.* 6: e01356-15.
- 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.
- Hanson WL**, McGhee RB. 1961. The Biology and Morphology of *Crithidia acanthocephali* n. sp., *Leptomonas Zeptoglossi* n. sp., and *Blastocrithidia euschisti* n. sp. *J. Protozool.* 8:200-204.
- Hebert PDN**, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270: 313-321.

- Hernandez R**, Diaz de Leon F, Castañeda M. 1988. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 275-280.
- Hernández R**, Rios P, Valdés AM, Piñero D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 41:207-212.
- Hillis DM**, Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol. 66:411-453.
- Hoare CA**, Wallace FG. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature 212: 1385-1386.
- Hoeijmakers JH**, Weijers PJ, Brakenhoff GJ, Borst P. 1982. Kinetoplast DNA in the insect trypanosomes *Crithidia luciliae* and *Crithidia fasciculata*. III. Heteroduplex analysis of the *C. luciliae* minicircles. Plasmid. 7:221-9.
- Hollar L**, Lukeš J, Maslov DA 1998. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. J Eukaryot Microbiol 45: 293-297.
- Honigberg BM**. 1963. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates." In Ludvík, J.; Lom, J.; Vávra J. (eds.). Progress in Protozoology: proceedings of the first International Congress on protozoology held at Prague. Academic Press: 68-69.
- Hood LE**, Hunkapillar MW, Smith LM. 1987. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. Genomics. 1:201-212.
- ICZN**. 1999. International Code of Zoological Nomenclature. 4th ed. The International Trust for Zoological Nomenclature, London.
- Jankevicius JV**, Jankevicius SI, Campaner M, Conchon I, Maeda LA, Teixeira MMG, Freymuller E, Camargo EP. 1989. Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. J. Protozool. 36: 265–271.
- Jankevicius JV**, Jankevicius SI, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, Carmo JB, Dutra-Menezes MCN, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csek YM, Borges MB, Moreira N. 1988. Ciclo Biológico de *Phytomonas*. Mem I Oswaldo Cruz.1:83-601.
- Jaskowska E**, Butler C, Preston G, Kelly S. 2015. *Phytomonas*: Trypanosomatids adapted to plant environment. PLoS Pathogens 11: 1004484.
- Jiménez MI**, López-Vélez R, Molina R, Cañavate C, Alvar, J. 1996. HIV-co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. Lancet. 347:264–265.
- 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.
- Katoh K**, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 30:772-780.
- Kent WS**. 1880–1881. A manual of the Infusoria, Vol. 1–3. David Bogue, London.
- Kher CP**, Doerder FP, Cooper J, Ikonomi P, Achilles-Day U, Küpper FC, Lynn DH. 2011. Barcoding Tetrahymena: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox-1*) barcode. Protist 162: 2-13.
- 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.
- Kolesnikov AA**, Maslov DA, Podlipaev SA. 1990. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR. Arch Protistenkd. 138:239-250.
- 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.
- Kraeva N**, Butenko A, Hlaváčová J, Kostygov A, Myškova J, Grybchuk D, Leštinová T, Votýpka J, Volf P, Opperdoes F, Flegontov P, Lukeš J, Yurchenko V. 2015. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. PLoS Pathog. 11: e1005127.
- Lafont A**. 1909. Sur la présence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des Flagellés dans le látex de l'*Euphorbia pilulifera*. C R Soc Biol. 66:1011-1013.
- Langridge DF**, McGhee RB. 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. J Protozool. 14:485-487.

- Lebonah DE**, Dileep A, Chandrasekhar K, Sreevani S, Sreedevi B, Kumari JP. 2014. DNA barcoding on bacteria: A Review. *Adv Biol* 2014: 1-9.
- Léger L**. 1902. Sur un flagelle parasite de *Anopheles maculipennis*. *Compte Rendu des Seances de la Societe de Biologie*, liv 354-356
- Leidy J**. 1856. A synopsis of Entozoa and some of their ectocongeners observed by the author. *Proc. Acad. Nut. Sci. Philadelphia* 8:42-58.
- 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.
- Lukeš J**, Guilbride DL, Voltýpka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. 1:495-502.
- 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.
- Lukeš J**, Skalický T, Týč J, Voltýpka J, Yurchenko V. 2014. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 195:115-122.
- 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 syl-vatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS1 ribosomal sequences. *Parasitology* 129: 549–561.
- Manaiá CA**, de Souza MCM, Lutoso ES, Roitman I. 1981. *Leptomonas lactosovorans* n. sp., a Lactose-Utilizing Trypanosomatid: Description and Nutritional Requirements. *J. Prorozool*. 28: 124-126.
- 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**, Podlipaev AS, Lukeš J. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96:397–402.
- Maslov DA**, Voltýpka J, Yurchenko V, Lukeš J. 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol*. 29:43-52.
- 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.
- 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
- Michels PA**, Poliszczak A, Osinga KA, Missel O, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P, Opperdoes FR. 1986. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehydephosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. 5:1049-1056.
- Miller RF**. 2000. Clinical presentation and significance of emerging opportunistic infections. *J Eukaryot Microbiol*. 47:21-23.
- 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*. 54:1861-1875.
- Morelli KA**, Boucinha C, Rodrigues M, Trannin MA, Boité MC, Cupolillo E, D'Avila-Levy CM. COI as molecular identification tool for Trypanosomatida (Euglenozoa, Kinetoplastea). (Manuscrito em preparação).
- Morio F**, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet JP, Ravel C. 2008. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol*. 46:3845-3847.
- Morris JC**, Drew ME, Klingbeil MM, Motyka SA, Saxowsky TT, Wang Z, Englund PT. 2001. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int J Parasitol*. 31:453-8.
- Motta MC**, Sole Cava AM, Silva PMF, Fiorini JE, Soares MJ, deSouza W. 1991. Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas anglusteri*. *Can J Zool*. 69: 571-577.
- Mukha D**, Wiegmann BM, Schal C. 2002. Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in the Blattodea (Insecta). *Insect Biochem Mol Biol*. 32:951-960
- Nassonova E**, Smirnov A, Fahrni J, Pawlowski J. 2010. Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist* 161: 102-115.

- Nicolle MC.** 1908. Culture du parasite du bouton d'Orient. C R Acad Sci 146: 842-843.
- Pacheco RS,** Marzochi MCA, Pires QM, Brito CMM, Madeira MF, Barbosa-Santos EGO. 1998. Parasite Genotypically Related to a Monoxenous Trypanosomatid of Dog's Flea Causing Opportunistic Infection in an HIV Positive Patient. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93: 531-537.
- 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: 101–105
- Pappas GJ Jr,** Benabdellah K, Zingales B, González A. 2005. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol. 142: 149-157.
- Patton WS.** 1908. The life-cycle of a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tract of *Gerris fossarum* Fabr. Arch. Protistenk. 12:131-146.
- Patton WS.** 1910. *Rhynchomonas luciliae*, nov.gen; nov.spec. A new flagellate parasitic in the malpighian tubes of *Lucilia serenissima* Walk. Bul Soc Pathol Éxotique 3:300–303.
- Pawlowski J,** Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, Berney C, Bowser SS, Čepička I, Decelle J, Dunthorn M, Fiore-Donno AM, Gile GH, Holzmann M, Jahn R, Jirků M, Keeling PJ, Kostka M, Kudryavtsev A, Lara E, Lukeš J, Mann DG, Mitchell EA, Nitsche F, Romeralo M, Saunders GW, Simpson AG, Smirnov AV, Spouge JL, Stern RF, Stoeck T, Zimmermann J, Schindel D, de Vargas C. 2012. CBOL Protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. PLoS Biol 10: e1001419.
- Perry RP.** 1976. Processing of RNA. Annu. Rev. Biochem. 45: 605-629.
- 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. 96:283-290.
- Podlipaev S,** Sturm N, Fiala I, Fernandes O, Westenberger S, Dollet M, Campbell D, Lukeš J. 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and
- Podlipaev S.** 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol. 31:648-52.
- Podlipaev SA** 1990. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). Zoologicheskii Institut AN SSSR. In Russian.
- Rodrigues JCF,** Godinho JLP, de Souza W. 2014. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: Robin Harris (Series Editor) *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma: Subcellular Biochemistry*. Springer. 1:1-42.
- Roger EW,** Wallace FG. 1971. Two New Subspecies of *Herpetomonas muscurum* (Leidy, 1856) Kent, 1880. J. Protozool. 18: 645-649.
- Roitman I,** Mundim MH, de Azevedo HP, Kitajima EW. 1977. Growth of *Crithidia* at High Temperature: *Crithidia hutneri* sp. n. and *Crithidia luciliae thermophila* s. sp. n. J Eukaryot Microbiol. 24::553 - 556.
- Roubaud E.** 1908. Sur un nouveau flagellé, parasite de l'intestin des muscids, au Congo franc,ais. C R Soc Biol. 64:1106–1108.
- Runckel C,** DeRisi J., Flenniken M L. 2014. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. PLoS ONE, 9: e95057.
- Saitou N,** Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4:406-425.
- Sanger F.** 1975. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 191:317-333.
- Santos ALS,** d'Avila-Levy CM, Dias FA, Ribeiro RO, Pereira FM, Elias CGR, Souto-Padrón T, Lopes AHCS, Alviano CS, Branquinha MH, Soares RMA. 2006. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion, Int. J. Parasitol. 36: 47-56.
- Schaub GA,** Breger B. 1988. Pathological effects of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the reduviid bugs *Triatoma sordida*, *T. pallidipennis* and *Dipetalogaster maxima* after coprophagic infection. Med Vet Entomol. 2: 309-318.
- Schaub GA,** Reduth D, Pudney M. 1990. The peculiarities of *Blastocrithidia triatomae*. Parasitol Today. 6:361-363.
- 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.
- 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.

- Serrano MG**, Campaner M, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. 1999. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol Lett.* 176:241-246.
- Shokralla S**, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology.* 21:1794–1805.
- Sibajev A**, Pacheco RS, Soares MJ, Cupolillo E., Dos Santos AB, Momen H. 1993. *Crithidia ricardo* sp.n. a new species of trypanosomatidae isolated from *Culex saltanensis* Dyar, 1928 (Diptera, Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88: 541-545.
- Simpson AGB**, Stevens JR, Lukeš J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22:168-174.
- Soares MJ**, Brazil RP, Tanuri A, de Souza W. 1986. Some ultrastructural aspects of *Crithidia guilhermei* n.sp. isolated from *Phaenicia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Can. J. Zool.* 64: 2837- 2842.
- Sousa MA**. 1994. Trypomastigotes in cultures of *B. culicis* (Novt, MacNeal & Torreey, 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89: 111-112.
- Stern RF**, Horak A, Andrew RL, Coffroth MA, Andersen RA, Küpper FC, Jameson I, Hoppenrath M, Véron B, Kasai F, Brand J, James ER, Keeling PJ. 2010. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate
- Stevens JR**, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. 2001a. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 48:1-56.
- Stevens JR**, Rambaut A. 2001b. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 1:143-150.
- Stevens JR**. 2008. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite.* 15:226-232.
- 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.
- Sturm NR**, Dollet M, Lukeš J, Campbell DA. 2007. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) based on minicircle conserved region analysis. *Infect. Genet. Evol.* 7: 570–576.
- Suarez AK**, Tsutsui ND. 2004. The value of museum collections for research and society. *Bioscience* 54: 66-73.
- Sundar S**, Chakravarty J. 2012. Recent advances in the diagnosis and treatment of kala-azar. *Natl Med J India.* 25: 85–89.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukeš J, Votýpka J.** 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol* 57:423–432.
- 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.
- 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.
- Teixeira MMG**, Campaner M, Camargo EP. 1995. Characterization of the target antigens of *Phytomonas*-specific monoclonal antibodies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 232-237.
- Teixeira MM**, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. 1996. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol.* 84:311-319.
- Teixeira MM**, Takata CS, Conchon I, Campaner M, Camargo EP. 1997. Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. *J Parasitol.* Feb;83(1):58-65.
- Thompson JD**, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tieszen K**, Heywood P, Molyneuh DH. 1983. Ultrastructure and host-parasite association of *Blastocrithidia gerridis* in the ventriculus of *Gerris odontogaster* (Gerridae: Hemiptera) *Can. J. Zool.* 61: 1900-1909.
- Týc J**, Votýpka J, Klepetková H, Šuláková H, Jirků M, Lukeš J. 2013. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): Frequent cosmopolitanism and moderate host specificity. *Mol Phylogenet Evol.* 69: 255-264.



- Vickerman K.** 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A. (ed.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London. p. 1–34.
- 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. 2009a. 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.
- Viola LB**, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MM. 2009b. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 136:55-65.
- 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.
- Votýpka J**, Klepetková H, Jirků M, Kment P, Lukeš J. 2012a. Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. *Int J Parasitol*. 42:489-500.
- Votýpka J**, Klepetková H, Yurchenko V, Horák A, Lukeš J, Maslov D. 2012b. Cosmopolitan distribution of a trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*. *Protist*. 163:616-631.
- 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**, 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.
- Wallace FG**, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. 1983. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J. Protozool*. 30:308-313.
- Wallace FG**, Clark TB, Dyer MI, Collins T. 1960. Two New Species of Flagellates Cultivated from Insects of the Genus *Gerris*. *J. Protozool*. 7: 390-392.
- Wallace FG**, Todd SR. 1964. *Leptomonas mirabilis* Roubaud 1908 in a Central American Blowfly. *J Protozool* 11:502–505.
- Wallace FG**. 1965. Flagellate parasites of water striders with a description of *Leptomonas costoris*, s. sp. *J. Protozool*. 12: 390-393.
- 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.
- Wenyon CM**. 1926. *Protozoology* vol. I. Bailliére, Tindall & Cox, London
- 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.
- Wheeler R J**, Gluenz E, Gull K. 2013. The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS ONE*, 8:e79581.
- White TC**, Rudenko G, Borst P. 1986. Three small RNAs within the IO kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28s rRNA. *Nucleic Acids Res*. 14: 9471-9489.
- Wu G**, Morris Jr SM. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J*. 336:1–17.
- Yoshida N**, Camargo EP. 1978. Uretelism and ammonotelism in trypanosomatids. *J. Bacteriol.*, 136:1184–1186.
- Yoshida N**, Freymuller E, Wallace FG. 1978. *Herpetomonas mariadeanei* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) from *Muscina st. abuZans* (Fallen, 18 16) (Diptera, Muscidae). *J. Protozool*, 25:421-425.
- Yourth CP**, Schmid-Hempel P. 2006. Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts. *Proc Biol Sci*. 273:655-659.
- Yurchenko V**, 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 V**, Kostygov A, Havlová J, Grybchuk-Ieremenko A, Ševčíková T, Lukeš J, Ševčík J, Votýpka J. 2016. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *J Eukaryot Microbiol.* 63:198-209.
- 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, 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**, Lukeš J, Xu X, Maslov DA. 2006a. An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 103–111.
- Yurchenko VY**, Lukeš J, Jirků M, Zeledón R, Maslov DA. 2006b. *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, Tesarová M, Jirků M, Maslov DA. 2008. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *crithidia*. *Protist.* 159:99-114.
- Zotta G.** 1921. Sur la transmission expérimentale du *Leptomonas pyrrocoris* Z. chez des insectes divers. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 85: 135-137.

## VII. ANEXOS

**Anexo I-** Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes SSUrRNA (a), gGAPDH (b) e COI (c) 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 II-** Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Angomonas* utilizadas no trabalho de Borghesan e colaboradores (2013). Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros

### SSUrRNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- HM593011 <i>Angomonas deanei</i>										
2- HM593012 <i>Angomonas deanei</i>	0,000									
3- AF038024 <i>Angomonas deanei</i>	0,001	0,001								
4- HM593013 <i>Angomonas deanei</i>	0,001	0,001	0,002							
5- HM593043 <i>Angomonas deanei</i>	0,003	0,003	0,003	0,003						
6- HM593014 <i>Angomonas deanei</i>	0,000	0,000	0,002	0,000	0,003					
7- HM593016 <i>Angomonas desouzai</i>	0,021	0,021	0,022	0,022	0,034	0,021				
8- HM593017 <i>Angomonas desouzai</i>	0,019	0,019	0,021	0,021	0,034	0,020	0,000			
9- HM593044 <i>Angomonas desouzai</i>	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,000	0,000		
10- HM593015 <i>Angomonas ambiguus</i>	0,021	0,021	0,023	0,022	0,037	0,022	0,010	0,010	0,016	

### gGAPDH

	1	2	3	4	5	6	7	8
1- HM593022 <i>Angomonas deanei</i>								
2- EU079130 <i>Angomonas deane</i>	0,004							
3- EU079131 <i>Angomonas deanei</i>	0,004	0,007						
4- HM593023 <i>Angomonas deanei</i>	0,024	0,022	0,025					
5- HM593024 <i>Angomonas deanei</i>	0,028	0,027	0,029	0,002				
6- HM593020 <i>Angomonas desouzai</i>	0,081	0,079	0,084	0,070	0,075			
7- HM593021 <i>Angomonas desouzai</i>	0,081	0,079	0,084	0,070	0,075	0,000		
8- HM593019 <i>Angomonas ambiguus</i>	0,075	0,073	0,073	0,064	0,069	0,040	0,040	

**Anexo III-** Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Herpetomonas* utilizadas no trabalho de Borghesan e colaboradores (2013). Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros

SSUrRNA		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1-	JQ359731 <i>H.muscarum</i>																				
2-	JQ359715 <i>H.muscarum</i>	0,000																			
3-	JQ359716 <i>H.samuelpeesoai</i>	0,088	0,089																		
4-	JQ359688 <i>H.samuelpeesoai</i>	0,080	0,080	0,000																	
5-	JQ359720 <i>H.isaaci</i>	0,029	0,028	0,080	0,067																
6-	JQ359709 <i>H.isaaci</i>	0,054	0,053	0,054	0,059	0,009															
7-	JQ359723 <i>H.puelarum</i>	0,046	0,046	0,056	0,043	0,036	0,061														
8-	JQ359691 <i>H.puelarum</i>	0,076	0,076	0,040	0,041	0,064	0,061	0,000													
9-	JQ359725 <i>H. elegans</i>	0,042	0,042	0,053	0,042	0,034	0,061	0,015	0,032												
10-	JQ359711 <i>H. elegans</i>	0,072	0,072	0,040	0,042	0,058	0,062	0,031	0,032	0,001											
11-	JQ359726 <i>H. modestus</i>	0,068	0,070	0,042	0,061	0,061	0,067	0,033	0,057	0,029	0,048										
12-	JQ359713 <i>H. modestus</i>	0,075	0,074	0,060	0,062	0,065	0,070	0,057	0,059	0,049	0,048	0,002									
13-	JQ359728 <i>H. costoris</i>	0,053	0,052	0,088	0,089	0,043	0,084	0,048	0,087	0,041	0,073	0,066	0,069								
14-	JQ359722 <i>H. samueli</i>	0,058	0,057	0,051	0,040	0,047	0,055	0,029	0,048	0,021	0,032	0,029	0,045	0,056							
15-	JQ359729 <i>H. mirabilis</i>	0,065	0,065	0,110	0,134	0,063	0,119	0,069	0,121	0,069	0,119	0,096	0,122	0,076	0,079						
16-	JQ359730 <i>H. wanderleyi</i>	0,072	0,072	0,115	0,136	0,069	0,120	0,075	0,122	0,076	0,122	0,104	0,125	0,082	0,084	0,016					
17-	JQ359714 <i>H.mariadeanei</i>	0,070	0,070	0,117	0,152	0,066	0,131	0,076	0,143	0,076	0,142	0,102	0,142	0,079	0,092	0,074	0,078				
18-	EU179326 <i>H. trimorpha</i>	0,066	0,065	0,093	0,105	0,063	0,105	0,062	0,090	0,065	0,104	0,085	0,106	0,068	0,077	0,079	0,084	0,080			
19-	AF416560 <i>H. ztiplika</i>	0,067	0,066	0,083	0,106	0,065	0,105	0,064	0,096	0,067	0,107	0,077	0,110	0,068	0,076	0,080	0,086	0,084	0,006		
20-	KR86869 <i>H. tarakana</i>	0,057	0,056	0,050	0,083	0,055	0,084	0,058	0,082	0,056	0,082	0,054	0,089	0,064	0,054	0,082	0,089	0,084	0,042	0,041	0,057

**(a)**

**gGAPDH**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1- JQ359748 <i>H.muscarum</i>														
2- JQ359743 <i>H.samuelpeoai</i>	0,130													
3- JQ359745 <i>H.isaaci</i>	0,082	0,116												
4- JQ359734 <i>H.puelarum</i>	0,099	0,094	0,082											
5- JQ359735 <i>H. elegans</i>	0,099	0,100	0,075	0,064										
6- JQ359736 <i>H. modestus</i>	0,120	0,098	0,107	0,103	0,099									
7- JQ359738 <i>H. costoris</i>	0,128	0,110	0,133	0,125	0,114	0,064								
8- JQ359742 <i>H. samueli</i>	0,120	0,085	0,102	0,092	0,102	0,095	0,109							
9- JQ359739 <i>H. mirabilis</i>	0,156	0,129	0,163	0,147	0,150	0,134	0,147	0,148						
10- JQ359740 <i>H. wanderleyi</i>	0,149	0,127	0,157	0,143	0,145	0,130	0,145	0,142	0,016					
11- JQ359741 <i>H.mariadeanei</i>	0,141	0,165	0,134	0,138	0,143	0,174	0,181	0,164	0,192	0,186				
12- FJ850241 <i>H. trimorpha</i>	0,202	0,207	0,204	0,208	0,206	0,203	0,214	0,214	0,220	0,219	0,236			
13- FJ850242 <i>H. ztiplika</i>	0,205	0,205	0,203	0,211	0,209	0,206	0,219	0,219	0,226	0,222	0,237	0,076		
14- KR868692 <i>H. tarakana</i>	0,133	0,080	0,117	0,092	0,094	0,099	0,115	0,091	0,135	0,134	0,164	0,212	0,216	

**(b)**

**Anexo IV-** Divergência nucleotídica das sequências dos genes SSUrRNA e gGAPDH entre gêneros de tripanossomatídeos com sequências disponíveis no Genbank. Foram utilizadas sequências dos gêneros *Angomonas*, *Strigomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Blechnomonas*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e *Crithidia*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros (em CD).

**Anexo V-** Divergência nucleotídica das sequências dos genes SSUrRNA e gGAPDH entre espécies de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

#### SSUrRNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1- COLPROT 011 <i>Phytomonas francai</i>									
2- COLPROT 174 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,014								
3- COLPROT 186 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,017	0,002							
4- COLPROT 187 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,017	0,002	0,003						
5- COLPROT 188 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,016	0,005	0,004	0,004					
6- COLPROT 189 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,017	0,002	0,007	0,007	0,004				
7- COLPROT 675 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,014	0,000	0,002	0,002	0,005	0,002			
8- COLPROT 245 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,013	0,002	0,003	0,003	0,004	0,003	0,002		
9- COLPROT 247 <i>Phytomonas.serpens</i>	0,013	0,002	0,003	0,003	0,004	0,003	0,002	0,000	

#### gGAPDH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- COLPROT 011 <i>Phytomonas francai</i>										
2- COLPROT 082 <i>Phytomonas francai</i>	0,000									
3- COLPROT 174 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078								
4- COLPROT 186 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000							
5- COLPROT 187 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000						
6- COLPROT 188 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000	0,000					
7- COLPROT 189 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000				
8- COLPROT 675 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
9- COLPROT 245 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
10- COLPROT 247 <i>Phytomonas serpens</i>	0,078	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

## Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era

Claudia Masini d'Avila-Levy<sup>1/+</sup>, Carolina Boucinha<sup>1</sup>, Alexei Kostygov<sup>2,3</sup>,  
Helena Lúcia Carneiro Santos<sup>1</sup>, Karina Alessandra Morelli<sup>1,4</sup>, Anastasiia Grybchuk-Ieremenko<sup>2</sup>,  
Linda Duval<sup>5</sup>, Jan Votýpka<sup>6,7</sup>, Vyacheslav Yurchenko<sup>2,6</sup>, Philippe Grellier<sup>5</sup>, Julius Lukeš<sup>6,8,9</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Coleção de Protozoários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>2</sup>University of Ostrava, Life Science Research Centre, Ostrava, Czech Republic <sup>3</sup>Russian Academy of Sciences, Zoological Institute, Laboratory of Molecular Systematics, St Petersburg, Russia <sup>4</sup>Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Ecologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>5</sup>Sorbonne Universités, Muséum National d'Histoire Naturelle, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes, Unités Mixte de Recherche 7245, Paris, France <sup>6</sup>Czech Academy of Sciences, Institute of Parasitology, Biology Centre, České Budějovice, Czech Republic <sup>7</sup>Charles University, Faculty of Science, Department of Parasitology, Prague, Czech Republic <sup>8</sup>University of South Bohemia, Faculty of Sciences, České Budějovice, Czech Republic <sup>9</sup>Canadian Institute for Advanced Research, Toronto, Canada

*The class Kinetoplastea encompasses both free-living and parasitic species from a wide range of hosts. Several representatives of this group are responsible for severe human diseases and for economic losses in agriculture and livestock. While this group encompasses over 30 genera, most of the available information has been derived from the vertebrate pathogenic genera Leishmania and Trypanosoma. Recent studies of the previously neglected groups of Kinetoplastea indicated that the actual diversity is much higher than previously thought. This article discusses the known segment of kinetoplastid diversity and how gene-directed Sanger sequencing and next-generation sequencing methods can help to deepen our knowledge of these interesting protists.*

Key words: Kinetoplastea - metagenomics - metabarcoding - taxonomy - Trypanosomatida

### Overview of kinetoplastid classification and diversity

Kinetoplastid protists belonging to the phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981) are characterised by the presence of a kinetoplast, which is the apomorphy for the group and which is easily identifiable as a large mass of mitochondrial DNA (kDNA) (Vickerman & Preston 1976, Adl et al. 2012). The distribution of kDNA within the mitochondrion has three patterns: compacted and lying close to the flagellar pocket (termed eukinetoplast), dispersed throughout the mitochondrial lumen in several identical clusters (termed polykinetoplast), or unevenly dispersed as a diffuse mass (termed pankinetoplast) (Fig. 1) (Lukeš et al. 2002, Moreira et al. 2004). The lifestyle (parasitic

vs. free-living, monoxenous vs. dixenous, intracellular vs. extracellular, and others), disease manifestation, and morphological traits have historically been used to classify these organisms (Lukeš et al. 2014, Votýpka et al. 2015a).

Recently, 18S (small subunit) rRNA-based phylogenetic analyses have led to extensive changes in the classification of kinetoplastid flagellates. The class Kinetoplastea, hierarchically equivalent to the formerly accepted order Kinetoplastida, is now divided into two subclasses: Prokinetoplastina and Metakinetoplastina (Moreira et al. 2004, Adl et al. 2012). The latter brings together four orders, of which the Trypanosomatida contains the majority of catalogued species. Notably, the National Center for Biotechnology Information database still uses the former version of classification, i.e., order Kinetoplastida, encompassing the families Bodonidae, Ichthyobodonidae and Trypanosomatidae (Fig. 2).

The order Trypanosomatida encompasses parasitic species responsible for economic losses in agriculture and livestock and for severe human diseases. The order Trypanosomatida is composed of a single family, Trypanosomatidae, which covers a diverse group of strictly parasitic unflagellated protists with either monoxenous or dixenous life cycles. Regarding the latter, Chagas disease, leishmaniases and African sleeping sickness are diseases caused by *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. and two subspecies of *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*), respectively, and these diseases affect millions of people worldwide (Vickerman 1994, Stuart et al. 2008). In addition to humans, a wide range of domestic and wild animals can be infected by *T. b. brucei*, *Trypanosoma congolense* and *Trypano-*

doi: 10.1590/0074-02760150253

Financial support: FP7 (316304), Bioglobe (CZ.1.07/2.3.00/30.0032) (to JL), Praemium Academiae (to JL), CAPES, MCT/CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ

VY is supported by the Moravskoslezský Kraj research initiative (MSK.DT1/2014, 00955/RRC/2015) and the Czech Science Foundation (P506/13/24983S), CMD-L receives fellowship from CNPq and FAPERJ, LD was supported by a post-doctoral grant of the LABEX BCDiv, AK worked in the context of state budgetary topic 01201376804 of ZIN RAS. CMD-L, VY, PG and JL contributed equally to this work.

+ Corresponding author: davila.levy@ioc.fiocruz.br

Received 7 July 2015

Accepted 1 October 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br

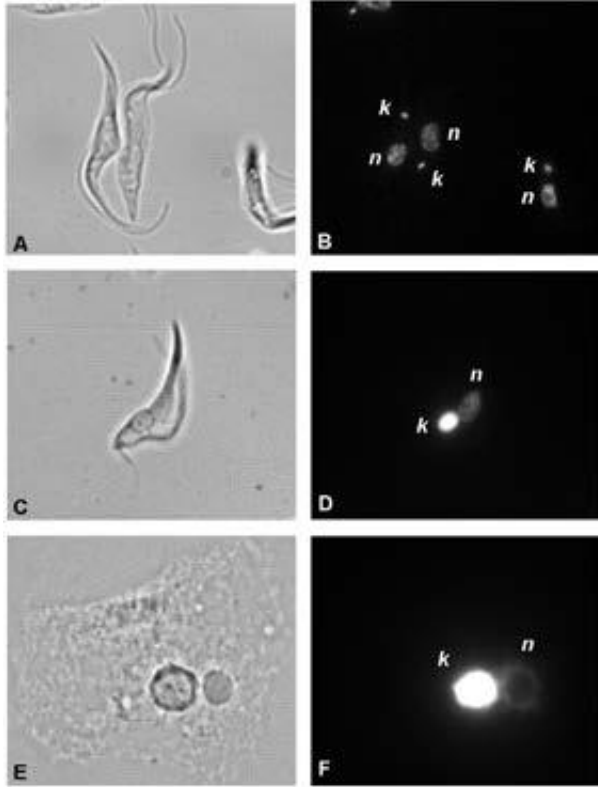


Fig. 1: images of the main patterns of kinetoplast DNA arrangement. Eukinetoplast of *Trypanosoma brucei* (A, B), pankinetoplast of *Trypanoplasma borreli* (C, D) and polykinetoplast (E, F) of *Perkinsela* sp. (A, C, E) bright field (B, D, F) DAPI staining. k: kDNA; n: nucleolus.

*soma vivax*, which are responsible for a complex of animal trypanosomiasis in Africa that are collectively called *nagana*. *T. b. evansi* causes a globally distributed disease called *surra* in domestic and wild animals found in Asia, Africa, South America, and Europe (Carnes et al. 2015), and several other species can occasionally cause atypical human trypanosomiasis (Truc et al. 2013). Moreover, new clades of potentially pathogenic trypanosomes are emerging in phylogenetic trees, further expanding the landscape of African trypanosomes (Votýpka et al. 2015b). Interestingly, some *Trypanosoma* or *Leishmania* species are nonpathogenic to mammals and can infect hosts such as lizards, fish, snakes and frogs (Simpson 1986, Simpson et al. 2006, Viola et al. 2009, Zídková et al. 2012, Grybchuk-Ieremenko et al. 2014, Stoco et al. 2014, Ferreira et al. 2015). Moreover, several *Phytomonas* species can cause damage to economically important fruits and plants such as coffee, corn, coconut, oil palm, and cassava, although the phytopathology is not well established (Dollet 1984, Camargo 1999, Jaskowska et al. 2015).

The most comprehensive and up-to-date catalogue of trypanosomatid genera and species was published 25 years ago and described known species, their synonymies, hosts, and distribution (Podlipaev 1990). Since then, substantial progress has been made in systematics and taxonomy primarily due to the introduction of molecular approaches. For a long time, trypanosomatid taxonomy was based solely on morphology and life cycles (Hoare & Wallace 1966, Vickerman 1976, McGhee & Cosgrove 1980), yet both parameters have a range of limitations, with morphology requiring the examiner to have a high level of proficiency (Fig. 3).

Phylum	Class	Subclass	Order	Genera
Euglenozoa	Kinetoplastea	Prokinetoplastina	Prokinetoplastida Polykinetoplastic kDNA	Ichthyobodo, Perkinsela
			Trypanosomatida Eukinetoplastic kDNA	Angomonas, Blastocrithidia, Blechnomonas, Crithidia, Endotrypanum, Herpetomonas, Kentomonas, Leishmania, Leptomonas, Letmeria, Paratrypanosoma, Phytomonas, Rhynchidiomonas, Sergella, Strigomonas, Trypanosoma, Wallaceomonas
	Euglenoidea	Metakinetoplastina	Neobodonida Eu-/polykinetoplastic kDNA	Actuoniria, Azamiobodo, Cruzella, Dimastigella, Klosteria, Neobodo, Rhynchobodo, Rhynchomonas
		Diplonemea	Eubodonida Eukinetoplastic kDNA	Bodo
		Symbiontida	Parabodonida Pankinetoplastic kDNA	Cryptobia, Parabodo, Procryptobia, Trypanoplasma

Fig. 2: updated taxonomy of kinetoplastids. The phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981) encompasses five classes, among which the class Kinetoplastea is subdivided into two subclasses. The bulk of the diversity described is within the Metakinetoplastina that is further subdivided into four orders. The order Kinetoplastida encompasses representatives responsible for human diseases and contains the largest number of described genera and species. This organogram compiles taxonomic data from Moreira et al. (2004) and Adl et al. (2012). It should be pointed out that the National Center for Biotechnology Information database still uses the formerly accepted classification, i.e., order Kinetoplastida encompassing three families: Bodonidae, Ichthyobodonidae and Trypanosomatidae.



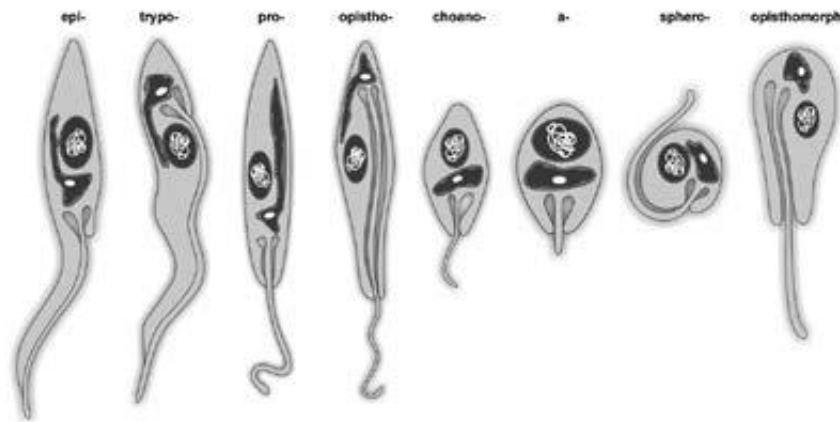


Fig. 3: schematic representation of the main morphological forms present in trypanosomatids. The main typical morphotypes observed are represented; the dash should be replaced by the word “mastigote”.

However, during the last decade, the traditional taxonomy has been integrated with DNA sequencing data. The 18S rRNA gene, glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (gGAPDH) and spliced leader (SL) RNA gene repeats are the most commonly used markers for molecular phylogenetic reconstructions of kinetoplastid flagellates (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) (Fig. 4). Using these molecular markers, species identification can be made by direct comparison with available DNA databases. However, if the match with the reference sequence is not full, the identification depends on accurate interpretation of molecular phylogenetic reconstructions

and a rather arbitrary decision regarding whether the difference is intraspecific, interspecific or intergeneric. Commonly, the reference sequences are not correctly re-assembled to updated taxonomic reclassifications, thus creating another challenging task of correctly comparing new isolates to previously described species.

In this sense, it is not surprising that our knowledge about the apparently extensive diversity of this group of protists remains fragmented. Moreover, a taxonomic bias towards vertebrate pathogenic species exists; this bias improves our knowledge of their nutritional requirements, therefore favouring their isolation and cultivation in vitro, leaving a vast segment of the free-living species diversity unexplored. Indeed, the order Trypanosomatida has more described genera and species than the sum of the other four orders (Fig. 2).

Insect and plant trypanosomatids, although not usually pathogenic to humans, have been widely used in basic research as model organisms to unveil aspects of cellular biology, biochemistry and genetics and in the search for antitrypanosomatid drugs (Hoare & Wallace 1966, Vickerman & Preston 1976, McGhee & Cosgrove 1980, Camargo 1999). Another possible explanation for the great expansion of the known trypanosomatid diversity not correlated with that of other groups of Kinetoplastea may be morphological uniformity and, hence, wide occurrence of cryptic species (Von der Heyden & Cavalier-Smith 2005). Exploring the diversity of the entire Kinetoplastea class is thus relevant for (i) filling the gaps in the tree of life, which would help to reconstruct more robust phylogenetic and evolutionary histories, (ii) comprehension of protistan synecology (i.e., the composition of their communities) and (iii) diversity inventory and conservation for future generations.

The primary aim of this article is to discuss achievements and potentials to screen kinetoplastid diversity directly within the hosts and in the environment using modern molecular approaches.

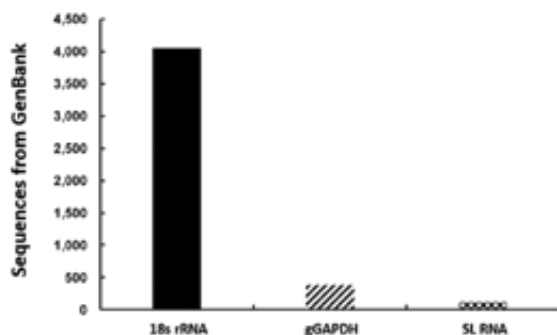


Fig. 4: comparison on the number of available kinetoplastid sequences from GenBank database. The most abundant sequences are: 18S (small subunit) rRNA gene, glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (gGAPDH) and spliced leader (SL) RNA. Mitochondrial cytochrome b, internal transcribed spacer one (ITS1) or two (ITS2) of rRNA, glucose 6 phosphate isomerase and the 70 kilodaltons heat shock protein also possess a considerable number of sequences, yet concentrated on *Leishmania* and *Trypanosoma*.

### Kinetoplastid diversity screen in the metagenomics era

Thus far, diversity and taxonomy studies have been based on polymerase chain reaction (PCR) amplification of molecular markers followed by DNA sequencing. This field is facing a dynamic and tremendous revolution. Over the past decade, the development of generations of sequencing technologies has resulted in an almost exponential increase in throughput and accuracy. Despite being relatively new, current sequencing techniques and associated bioinformatics analyses are now highly accurate and reasonably priced, with whole-genome sequencing of eukaryotes becoming a standard approach.

Complete genomic data of reference organisms are the best sources of information for diversity and phylogenetic studies. However, free-living protist genome projects encompass only a small fraction of completed and ongoing eukaryotic genome projects (Dawson & Fritz-Laylin 2009, del Campo et al. 2014), and the primary impediment to sequencing genomes is the scarcity of representative free-living protists in stable, axenic cultures (Dawson & Fritz-Laylin 2009). From 2,213 fully sequenced eukaryotic genomes, 59 belong to kinetoplastid protists, the majority of which pertain to the genera *Leishmania* (n = 24) and *Trypanosoma* (n = 16); these genera are over-represented due to their medical importance. The other genera with available genomic data are as follows: *Crithidia* (n = 3), *Leptomonas* (n = 2), *Trypanoplasma* (n = 1), *Strigomonas* (n = 4), *Angomonas* (n = 3), *Lotmaria* (n = 1), *Herpetomonas* (n = 1), *Endotrypanum* (n = 1), *Bodo* (n = 1) and *Phytomonas* (n = 3) (ncbi.nlm.nih.gov/genomes, sanger.ac.uk, tritrypdb.org). High-quality, well-annotated genomes are available for trypanosomatids. Additionally, molecular tools, such as gene knockouts, ectopic gene expression, RNAi and CRISPR, have been developed to improve genome annotation and to determine gene function and localisation (Dean et al. 2015). New bioinformatics tools for reanalysis of genome databases allow further identification of “partial” genes that can be categorised as C-terminal extensions, gene joining, tandemly repeated paralogs and wrong chromosomal assignments (Pawar et al. 2014).

The microeukaryotic diversity that resides in ecological niches such as animal microbiotas (for instance, insect gut or salivary glands), lakes, oceans and soil remains poorly understood (Foster et al. 2012, Weinstock 2013). Furthermore, any existing relationships among these species remain largely undiscovered. Due to the reduction in costs, labour intensity and time, new generation sequencing has the potential to reveal both the diversity and/or ecological and metabolic functions in virtually any environment. A recent salient example is the qualitative and quantitative new insights into this problem achieved by the Tara Oceans project, which not only massively extended the known eukaryotic diversity in the world oceans (de Vargas et al. 2015), but also explored a wealth of putative interactions among them (Lima-Mendez et al. 2015). However, because DNA sequencing from environmental samples generates a large amount of information, correctly and clearly formulated questions are of major importance.

The concept of DNA metabarcoding relies upon the identification of species present in environmental samples directly, without the need for microscopic observation or cultivation. This method is performed by direct extraction of DNA and PCR amplification of a selected gene (fragment) used to barcode the targeted group of eukaryotes (Pompanon et al. 2011, Epp et al. 2012, Taberlet et al. 2012, Aylagas et al. 2014, Pompanon & Samadi 2015). The metabarcoding approach aims to answer the following question: who is out there? In contrast, metagenomics aspires to functionally analyse the whole DNA present in a given sample from the perspective of the following question: how does the organismal assembly function? The two approaches have thus far been used by the research community somewhat indistinctly, although a distinction is advisable (Mendoza et al. 2015).

The utilisation of DNA sequences of short standardised gene fragments for quick and accurate determination of the species is called DNA barcoding. Because no consensus of a single marker able to distinguish and classify all the species on the planet exists, group-specific markers have been proposed (Pawlowski et al. 2012) (also see BOLD; boldsystems.org/). The regions of the mitochondrial gene encoding cytochrome *c* oxidase subunit 1 (CO1) and mitoribosomal RNAs are used for animals (Hebert et al. 2003), while two large subunits of the chloroplast RuBisCO and maturase K genes are used for plants, 16S rRNA for bacteria, internal transcribed spacer region 1 for fungi, and some other genes for less studied groups (Pawlowski et al. 2012). Although CO1 was shown to be insufficient for species delimitations for many microorganisms (Begerow et al. 2010, Pawlowski et al. 2012, Lebonah et al. 2014), it is applicable to a number of eukaryotic groups including trypanosomatids (Chantangsi et al. 2007, Nasonova et al. 2010, Stern et al. 2010, Kher et al. 2011, KA Morelli et al., unpublished observations). However, a consensual barcoding approach for kinetoplastids does not exist, although barcoding by means of 18S rRNA and gGAPDH is applied frequently.

The majority of the microeukaryotic diversity remains undiscovered primarily due to the methodological approaches used to assess it. While prokaryotic diversity studies are based mainly on 16S rRNA sequencing of their communities, for historical reasons, protistan diversity described without the establishment of axenic cultures and/or microscopic observation was considered incomplete and insufficient during the genomic era (Votýpka et al. 2015a). The identification of a kinetoplastid species has been traditionally based on its introduction into an axenic culture, with the culture-dependent approach considered critical for species validation. However, although establishment in culture is not feasible in many cases, the metabarcoding approach is not yet widely used even in studies of protistan diversity (Stoeck et al. 2005, Von der Heyden et al. 2005, Sauvadet et al. 2010, McCarthy et al. 2011, Bates et al. 2013, Glaser et al. 2014). Other hurdles include the low number of reference genomes in databases available for comparison and difficulties in establishing universally accepted markers (Sturm et al. 2008), as discussed above. In many cases, culture establishment is prevented by our limited

knowledge of kinetoplastid metabolism and nutritional requirements, which is improving at a very slow pace even in well-studied groups (Škodová-Sveráková et al. 2015). Consequently, we are confined only to the cultivable fraction of protist diversity. Direct microscopic observation of environmental samples provides substantial morphological and ecological data related to eukaryotic communities in vivo. However, these data are hard to compare with the existing formally recognised species primarily due to high morphological variability (Dawson & Fritz-Laylin 2009, Votýpka et al. 2015a). Culture-independent approaches to assess diversity, such as single-cell sequencing methodology, which was recently successfully applied to protists (Kolísko et al. 2014), should help address these questions. Overall, the exploration of protistan diversity in general and kinetoplastid diversity in particular, appears significantly restrained by established and rather rigid traditional approaches.

### Genes used for molecular phylogeny of kinetoplastids

The SL RNA gene has been repeatedly used to explore trypanosomatid diversity using either parasites isolated in culture or direct insect gut contents, allowing many new trypanosomatid taxa to be described (Westenberger et al. 2004, Maslov et al. 2007, 2010, Yurchenko et al. 2008, 2009, Votýpka et al. 2010, 2012, 2013, 2014, Wilfert et al. 2011). This gene is absent from host genomes and from nonkinetoplastid microorganisms that could occur within such samples (Westenberger et al. 2004). The SL RNA gene consists of regions with different levels of variability (exon, intron, and intergenic spacer variability), which makes this gene suitable for both inter and intraspecific comparisons. Additionally, differences in the product amplification length among trypanosomatid species often allow the detection of mixed infections by standard agarose gel electrophoresis.

Species discrimination using the SL RNA gene is based on a 90% sequence similarity threshold (Westenberger et al. 2004). Although this criterion is arbitrary, it has withstood scrutiny and has provided a simple operational rule necessary for broad-scale studies. Hence, this criterion is an integral part of taxonomic studies of insect trypanosomatids (Kostygov et al. 2014).

Meanwhile, using the SL RNA gene in diversity studies has several disadvantages, particularly for PCR-based approaches. First, universal primers for this marker are not suitable for its amplification in some trypanosomatids (Podlipaev et al. 2004), making its use for metabarcoding analysis of the entire Kinetoplastea class questionable. Thus, SL RNA-based mapped diversity may be narrower than the actual diversity. Second, the very short conserved region of the gene (the exon and intron together are approximately 100 bp in length) does not provide sufficient data for deeper phylogenetic analysis. Third, different SL RNA gene classes varying in size and sequence have been described in a few species (Lamontagne & Papadopoulou 1999), yet this finding was not confirmed by whole-genome analyses (Berriman et al. 2005, Thomas et al. 2005). Fourth, the size differences of SL RNA gene repeats lead to competitive amplification favouring shorter PCR products. Hence, in the case of

mixed infections, some species with longer repeats may remain undetected; this particular issue can be effectively addressed using new generation sequencing.

Due to these disadvantages, several research groups adopted a more habitual marker in diversity studies, the 18S rRNA gene, which can be amplified either from environmental samples or from cultured materials. The usage of different kinetoplastid-specific primers allows either the nearly complete gene or its most variable part to be obtained (Maslov et al. 1996, Kostygov & Frolov 2007, Votýpka et al. 2015b). Thus far, the 18S rRNA gene has been successfully used in diversity studies not only for insect trypanosomatids (Votýpka et al. 2010, 2012, Týč et al. 2013), but also for fish trypanosomes and trypanoplasms (Grybchuk-Ieremenko et al. 2014, Losev et al. 2015), as well as for flagellates from deep-sea samples (Sauvadet et al. 2010, Scheckenbach et al. 2010, Pawłowski et al. 2011, Salani et al. 2012, de Vargas et al. 2015). A few reports used the 18S rRNA gene to scrutinise lake sediments (van Hannen et al. 1999) and soil (Glaser et al. 2014). No generally accepted criterion of species discrimination exists based on this gene most likely due to its unpredictable variability in different groups of eukaryotes. For example, the observed multiple closely related haplotypes of this gene in trypanosomes parasitising fishes suggest that some intraspecific variability of this marker exists within the given group (Grybchuk-Ieremenko et al. 2014).

### Assessment of molecular diversity by metagenomic approaches

Comprehensive assessment of the molecular diversity of unicellular eukaryotes retrieved from deep-sea water has been the focus of several studies in the past 15 years. Although prokaryotic communities have been studied extensively, protists have been generally much less explored in aquatic environments, where they thrive even under conditions of high pressure, high toxic product concentrations and high and low temperatures. A study devoted to revealing microeukaryotic diversity in the abyssal sea floor of the Atlantic Ocean used general eukaryotic and kinetoplastid-specific primers to discover members of the genera *Ichthyobodo*, *Rhynchobodo* and *Neobodo* (Scheckenbach et al. 2010). In cultivation-independent studies of the South Atlantic, Mediterranean and other sites, kinetoplastid-specific 18S rRNA primers were used to detect *Neobodo designis*, *Rhynchobodo* sp. and *Ichthyobodo*. Notably, a particular percentage of identical clones is shared among even geographically distant regions, suggesting global distribution (Von der Heyden & Cavalier-Smith 2005, Salani et al. 2012). Protist community surveys from deep-sea waters from hydrothermal vents in the Pacific Ocean using general 18S rRNA primers revealed the presence of *Bodo* sp. and *Bodo saliens* (Brown & Wolfe 2006, Sauvadet et al. 2010). In other hydrothermal areas in the Mid-Atlantic Ridge and the eastern Pacific Ocean, kinetoplastids such as *Ichthyobodo necator*, *Proccryptobia sorokini*, *Rhynchomonas nasuta*, *Bodo saltans* and *B. saliens* were also abundant (Atkins et al. 2000, López-García et al. 2003). Although these data reveal the ubiquitous dis-

tribution of kinetoplastids and their exciting plasticity, which allows them to adapt to extreme environments, no cultured representatives from these environments are available. In spite of these advances, deep-sea kinetoplastid sequences have disproportionately low representation in public databases (Salani et al. 2012). An extensive 18S rRNA metabarcoding study of the sunlit zone of the world oceans by the Tara Oceans initiative revealed a surprisingly highly abundant presence of diplomonads (Lukeš et al. 2015) and a much less conspicuous presence of kinetoplastids (de Vargas et al. 2015). In another 18S rRNA-based survey targeting aquatic microeukaryotes in The Netherlands, sequences related to parasitic trypanosomatids have been described (van Hannen et al. 1999). However, their re-analysis against recently available sequences revealed their high identity with *N. designis* (KA Morelli, unpublished observations).

A cultivation-independent survey of kinetoplastid diversity in soil employed 18S rRNA primers and revealed an abundance of sequences related to the neobodonid clade, followed by parabodonids and eubodonids (Glaser et al. 2014). While approximately 30% of the obtained sequences have low similarity to databases, whether these sequences are derived from unknown taxa, the so-called rare biosphere, or represent methodological “noise” remains to be established (Glaser et al. 2014). In a study that aimed to investigate the role of free-living protists in contaminated food, *Bodo* sp. and *Parabodo caudatus* were frequently detected, along with related sequences with low BLAST scores (Vaerewijck et al. 2008).

Collectively, these data emphasise the need for more comprehensive studies targeting free-living kinetoplastids, the diversity of which remains fractionated, underestimated and, consequently, poorly taxonomically and phylogenetically studied. As a result of the increasing application of 18S rRNA gene-based approaches, new protistan phylotypes are constantly being revealed (López-García et al. 2001, Taib et al. 2013), improving our knowledge of the diversity, distribution and function of eukaryotic microorganisms.

### Museums and institutional collections as a basis for diversity screening

In comparison to macroscopic eukaryotes, protist collections are generally unknown to the public certainly because they concern microscopic organisms that are not spectacular or emblematic. These collections are often accumulated in dusty boxes of slides stored on shelves in an obscure corner. However, for protistologists, such collections are gold mines primarily because they contain type material (hapantotypes) deposited since the end of the XIX century by generations of scientists (Votýpka et al. 2015a).

With the beginning of the molecular era in the 1990s, natural history collections evolved to meet the challenges of the current and future interdisciplinary studies. Many institutions developed new collections and information databases (DNA, tissues, cultures, cryobanks, photographs, ethanol-fixed specimens, publication collections, and geographical and ecological information databases), which are of first-rate importance, offering

opportunities to conduct integrative studies, including temporal and spatial surveys (Suarez & Tsutsui 2004).

With the worldwide awareness of the dramatic erosion of both macro and microorganismal diversity, the necessity of its inventory and preservation is now a priority. Many museums and academic institutions are engaged in large surveys in diversity hot spots [see for example [laplaneterevisitee.org/en/](http://laplaneterevisitee.org/en/) (Bouchet et al. 2008)]. In addition to traditional taxonomy, DNA barcoding approaches are used to describe diversity. Furthermore, recent works have demonstrated the possibility of extracting relevant genetic information from ancient archived specimens such as archaeological remains (Frías et al. 2013), formalin-fixed tissues (Gilbert et al. 2007), and fixed and stained smears (Hayes et al. 2014). For a long time, such material was considered useless for molecular analyses due to DNA degradation. Studies on ancient human remains have changed the widely accepted theory of the origin of Chagas disease. Approximately 9,000-year-old pre-Colombian mummies were shown to be PCR-positive for *T. cruzi*, indicating that Chagas disease is at least as old as human presence in the Americas (Aufderheide et al. 2004). Another example derived from the museum collections is the rapid extinction of endemic rats on Christmas Island around the year 1900 due to *Trypanosoma lewisi* introduced by black rats and their fleas (Wyatt et al. 2008).

The possibility of extracting DNA suitable for amplification from fixed and stained blood smears and other difficult samples opens new avenues for the molecular characterisation of kinetoplastid type specimens deposited in collections. Their potential use in studying kinetoplastid diversity can be illustrated by the recent work on trypanosomes of marine fishes from South Africa and their leech vectors (Hayes et al. 2014).

### Trends in metabarcoding of kinetoplastids

Direct sequencing of the environmental DNA, either total or focused on barcoding markers, has been the basis for “blind” diversity screens. After the early studies of diversity through direct DNA sequencing, the overall ratio of cultivable microorganisms has been generally accepted not to exceed 1% of the total diversity on earth (Pace 1997). For protists in particular, less than 10% of the sequences revealed by cultivation-independent molecular surveys were previously known (Šlapeta et al. 2005, Medinger et al. 2010). These approaches revealed not only putatively novel species, but also new kingdoms (Dawson & Pace 2002, Berney et al. 2004, Cavalier-Smith 2004). However, these data are problematic because nothing beyond the molecular signature is known, such as morphological and/or biochemical characteristics of the new organisms, their ecological roles, or in situ abundance. Hence, we can only speculate whether these distinct molecular signatures represent existing unknown microbes or are only methodological artefacts.

Although taxonomic information of an unknown microorganism through DNA sequencing is interesting *per se*, ideally, this information must be combined with morphological, biochemical and ecological data (Votýpka et al. 2015a). For example, in the order Neobodonida, an

undescribed sequence indicated the existence of a novel clade that appeared to consist of free-living organisms from aquatic and terrestrial habitats (López-García et al. 2003, Von der Heyden & Cavalier-Smith 2005). However, no cultured representatives of this clade were available. Later, a diversity survey using combined molecular and culturing approaches succeeded in isolating and culturing an organism that branched within that undescribed neobodonid clade according to its phylogenetic position (Stoeck et al. 2005).

Another issue to consider while screening environmental sequences is whether the infrequent sequences are indeed members of a highly diverse microbial “rare biosphere” or only represent sequencing artefacts. To address this question, tintinnid ciliates, a species-rich group that can be easily distinguished morphologically, were surveyed to assess the accuracy of 18S rRNA pyrosequencing of Mediterranean samples with different patterns of tintinnid diversity. The inferred number of typing units outnumbered tintinnid cells in the samples, which was found to be primarily dependent on the data treatment, suggesting that many undescribed environmental sequences might indeed be artefacts (Bachy et al. 2013).

The intention of this review is to critically evaluate the usefulness of methodological advances for studies of kinetoplastid diversity. The scarcity of protist environmental data is a large obstacle for the perception of true eukaryotic diversity. An analysis of the SILVA SSU database of the eukaryotic phyla (Pruesse et al. 2007) showed that less than 5% of the 18S rRNA sequences originated from protists (Pace 2009). A recent re-evaluation of environmental studies revealed that protists that were previously overlooked constitute the bulk of extant eukaryotic diversity (Pawlowski et al. 2011).

Metabarcoding has become a fundamental approach for diversity assessment in recent years. The possibility of revealing previously unknown microorganisms through metabarcoding and the potential of unveiling their physiology and ecology through metagenomics pose great opportunities and challenges to protistologists.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To all the members of our laboratories, for helpful and stimulating discussions, and to Dr Marta H Branquinha and André LS Santos (Institute of Microbiology Prof Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro), for critical reading of the paper.

#### REFERENCES

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick RS, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429-493.
- Atkins MS, Teske AP, Anderson OR 2000. A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the eastern Pacific Ocean using structural and molecular approaches. *J Eukaryot Microbiol* 47: 400-411.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Allison M 2004. A 9,000-year record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039.
- Aylagas E, Borja A, Rodríguez-Ezpeleta N 2014. Environmental status assessment using DNA metabarcoding: towards a genetics based marine biotic index (gAMBI). *PLoS ONE* 9: e90529.
- Bachy C, Dolan JR, López-García P, Deschamps P, Moreira D 2013. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME J* 7: 244-255.
- Bates ST, Clemente JC, Flores GE, Walters WA, Parfrey LW, Knight R, Fierer N 2013. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *ISME J* 7: 652-659.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 99-108.
- Berney C, Fahrni J, Pawlowski J 2004. How many novel eukaryotic ‘kingdoms’? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys. *BMC Biol* 2: 13.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renaud H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Brin-gaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 310: 416-422.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MM, Camargo EP 2013. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* 164: 129-152.
- Bouchet P, Héros V, Lozouet P, Maestrati P 2008. A quarter-century of deep-sea malacological exploration in the South and West Pacific: where do we stand? How far to go? In V Héros, RH Cowe, P Bouchet (eds.), *Tropical deep-sea Benthos* 25, Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, p. 9-40.
- Brown PB, Wolfe GV 2006. Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen Volcanic National Park, USA. *J Eukaryot Microbiol* 53: 420-431.
- Camargo EP 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29-112.
- Carnes J, Anupama A, Balmer O, Jackson A, Lewis M, Brown R, Cestari I, Desquesnes M, Gendrin C, Gibson W, Hertz-Fowler C, Imamura H, Ivens A, Jansen A, Kořený L, Lai D-H, MacLeod A, Martin D, McDermott SM, Merritt C, Monnerat S, Moon W, Myler P, Phan I, Ramasamy G, Sivam D, Lun Z-R, Lukeš J, Stuart K, Schnauffer A 2015. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3404.
- Cavalier-Smith T 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14: 461-481.

- Cavalier-Smith T 2004. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 271: 1251-1262.
- Chantangsi C, Lynn DH, Brandl MT, Cole JC, Hetrick N, Ikonomi P 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2412-2425.
- 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.
- Dawson SC, Fritz-Laylin LK 2009. Sequencing free-living protists: the case for metagenomics. *Environ Microbiol* 7: 1627-1631.
- Dawson SC, Pace NR 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8324-8329.
- de Vargas C, Audic S, Henry N, Decelle J, Mahé F, Logares R, Lara E, Berney C, Le Bescot N, Probert I, Carmichael M, Poulain J, Romac S, Colin S, Aury J-M, Bittner L, Chaffron S, Dunthorn M, Engelen S, Flegontova O, Guidi L, Horák A, Jaillon O, Mendez GL, Lukeš J, Malviya S, Morard R, Mulot M, Scalco E, Siano R, Vincent F, Zingone A, Dimier C, Picheral M, Searson S, Kandels-Lewis S, Acinas SG, Bork P, Bowler C, Gaill F, Gorsky G, Grimsley N, Hingcamp P, Iudicone D, Not F, Ogata H, Pesant S, Raes J, Sieracki M, Speich S, Stemmann L, Sunagawa S, Weissenbach J, Wincker P, Karsenti E 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit global ocean. *Science* 348: 1261605.
- Dean S, Sunter J, Wheeler RJ, Hodkinson I, Gluenz E, Gull K 2015. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol* 5: 140197.
- del Campo J, Sieracki ME, Molestina R, Keeling P, Massana R, Ruiz-Trillo I 2014. The others: our biased perspective of eukaryotic genomes. *Trends Ecol Evol* 29: 252-258.
- Dollet M 1984. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). *Annu Rev Phytopathol* 22: 115-132.
- Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Mol Ecol* 21: 1821-1833.
- Ferreira JJ, da Costa AP, Ramirez D, Roldan JA, Saraiva D, Fournier GFS, Sue A, Zambelli ER, Minervino AH, Verdade VK, Genari SM, Marcili A 2015. Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. *Syst Parasitol* 91: 63-70.
- Foster JA, Bunge J, Gilbert JA 2012. Measuring the microbiome: perspectives on advances in DNA-based techniques for exploring microbial life. *Brief Bioinform* 13: 420-429.
- Frías L, Leles D, Araújo A 2013. Studies on protozoa in ancient remains - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 1-12.
- Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M 2007. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS ONE* 2: e537.
- Glaser K, Kuppardt A, Krohn S, Heidtmann A, Harms H, Chatzinotas A 2014. Primer pairs for the specific environmental detection and T-RFLP analysis of the ubiquitous flagellate taxa Chrysophyceae and Kinetoplastea. *J Microbiol Methods* 100: 8-16.
- Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Kostygov AY, Lukeš J, Yurchenko V 2014. High prevalence of trypanosome co-infections in freshwater fishes. *Folia Parasitol* 61: 495-504.
- 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.
- Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ 2014. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasit Vectors* 7: 50.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270: 313-321.
- 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.
- Jaskowska E, Butler C, Preston G, Kelly S 2015. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environment. *PLoS Pathogens* 11: e1004484.
- Kher CP, Doerder FP, Cooper J, Ikonomi P, Achilles-Day U, Küpper FC, Lynn DH 2011. Barcoding Tetrahymena: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode. *Protist* 162: 2-13.
- Kolísko M, Boscaro V, Burki F, Lynn DH, Keeling PJ 2014. Single-cell transcriptomics for microbial eukaryotes. *Curr Biol* 24: R1081-R1082.
- Kostygov A, Frolov AO 2007. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock 1914: a leptomonas or a blastocystid? *Parazitologiya* 41: 126-136.
- Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V 2014. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist* 165: 594-604.
- Lamontagne J, Papadopoulou B 1999. Developmental regulation of spliced leader RNA gene in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J Biol Chem* 274: 6602-6609.
- Lebonah DE, Dileep A, Chandrasekhar K, Sreevani S, Sreedevi B, Kumari JP 2014. DNA barcoding on bacteria: A Review. *Adv Biol* 2014: 1-9.
- Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, Decelle J, Colin S, Carcillo F, Chaffron S, Ignacio-Espinosa JC, Roux S, Vincent F, Bittner L, Darzi Y, Wang J, Audic S, Berline L, Bontempi G, Cabello AM, Coppola L, Cornejo-Castillo FM, d'Ovidio F, De Meester L, Ferrera I, Garet-Delmas M-J, Guidi L, Lara E, Pesant S, Royo-Lluch M, Salazar G, Sánchez P, Sebastian M, Souffreau C, Dimier C, Picheral M, Searson S, Kandels-Lewis S, Tara Oceans coordinators, Gorsky G, Not F, Ogata H, Speich S, Stemmann L, Weissenbach J, Wincker P, Acinas SG, Sunagawa S, Bork P, Sullivan MB, Karsenti E, Bowler C, de Vargas C, Raes J 2015. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* 348 doi: 10.1126/science.1262073.
- López-García P, Philippe H, Gail F, Moreira D 2003. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 697-702.
- López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, Moreira D 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409: 603-607.
- Losev A, Grybchuk-Ieremenko A, Kostygov AY, Lukeš J, Yurchenko V 2015. Host specificity, pathogenicity, and mixed infections of trypanoplasms from freshwater fishes. *Parasitol Res* 114: 1071-1078.
- Lukeš J, Flegontova O, Horák A 2015. Diplonemids. *Curr Biol* 25: R1-R3.
- Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* 1: 495-502.
- Lukeš J, Jirků M, Doležel D, Král'ová I, Hollar L, Maslov DA 1997. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol* 44: 521-527.

- Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V 2014. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol* 195: 115-122.
- Maslov DA, Lukeš L, Jirku 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, Westenberger SJ, Xu X, Campbell DA, Sturm NR 2007. Discovery and barcoding by analysis of spliced leader RNA gene sequences of new isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador. *J Eukaryot Microbiol* 54: 57-65.
- 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.
- McCarthy CB, Diambra LA, Pomar RVR 2011. Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis using an unbiased high-throughput approach. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1304.
- McGhee R, Cosgrove WB 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 44: 140-173.
- Medinger R, Nolte V, Pandey RV, Jost S, Ottenwälder B, Schlötterer C, Boenigk J 2010. Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Mol Ecol* 19: 32-40.
- Mendoza MLZ, Sicheritz-Pontén T, Gilbert MTP 2015. Environmental genes and genomes: understanding the differences and challenges in the approaches and software for their analyses. *Brief Bioinform* 16: 745-758.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Lep- tomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Microbiol* 48: 161-169.
- 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: 1861-1875.
- Nassonova E, Smirnov A, Fahrni J, Pawlowski J 2010. Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist* 161: 102-115.
- Pace N 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Pace N 2009. Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 565-576.
- Pawar H, Kulkarni A, Dixit T, Chaphekar D, Patole MS 2014. A bioinformatics approach to reanalyze the genome annotation of kinetoplastid protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Genomics* 104: 554-561.
- Pawlowski J, Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, Berney C, Bowser SS, Čepička I, Decelle J, Dunthorn M, Fiore-Donno AM, Gile GH, Holzmann M, Jahn R, Jirků M, Keeling PJ, Kostka M, Kudryavtsev A, Lara E, Lukeš J, Mann DG, Mitchell EA, Nitsche F, Romeralo M, Saunders GW, Simpson AG, Smirnov AV, Spouge JL, Stern RF, Stoeck T, Zimmermann J, Schindler D, de Vargas C 2012. CBOL Protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biol* 10: e1001419.
- Pawlowski J, Christen R, Lecroq B, Bachar D, Shahbazkia HR, Amaral-Zettler L, Guillou L 2011. Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. *PLoS ONE* 6: e18169.
- Podlipaev SA 1990. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proc Zool Inst Leningrad* 144: 1-178.
- Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukeš J 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *J Eukaryot Microbiol* 51: 283-290.
- Pompanon F, Coissac E, Taberlet P 2011. Metabarcoding, une nouvelle façon d'analyser la biodiversité. *Biofutur* 319: 30-32.
- Pompanon F, Samadi S 2015. Next generation sequencing for characterizing diversity: promises and challenges. *Genetica* 143: 133-138.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188-7196.
- Salani FS, Arndt H, Hausmann K, Nitsche F, Scheckenbach F 2012. Analysis of the community structure of abyssal kinetoplastids revealed similar communities at larger spatial scales. *ISME J* 6: 713-723.
- Sauvadet AL, Gobet A, Guillou 2010. Comparative analysis between protist communities from the deep-sea pelagic ecosystem and specific deep hydrothermal habitats. *Environ Microbiol* 12: 2946-2964.
- Scheckenbach F, Hausmann K, Wylezich C, Weitere M, Arndt H 2010. Large-scale patterns in biodiversity of microbial eukaryotes from the abyssal sea floor. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 115-120.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 4: 168-174.
- Simpson L 1986. Behavior of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae* upon cell rupture. *J Protozool* 15: 132-136.
- Škodová-Sveráková I, Verner Z, Skalický T, Votýpka J, Horváth A, Lukeš J 2015. Lineage-specific activities of a multipotent mitochondrion of trypanosomatid flagellates. *Mol Microbiol* 96: 55-67.
- Šlapeta J, Moreira D, Lopez-Garcia P 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proc Biol Sci* 272: 2073-2081.
- Stern RF, Horak A, Andrew RL, Coffroth MA, Andersen RA, Küpper FC, Jameson I, Hoppenrath M, Véron B, Kasai F, Brand J, James ER, Keeling PJ 2010. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. *PLoS ONE* 5: e13991.
- Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, Thompson CE, Bartholomeu DC, Lückemeyer DD, Bahia D, Loreto E, Prestes EB, Lima FM, Rodrigues-Luiz G, Vallejo GA, da Silveira Filho JF, Schenkman S, Monteiro KM, Tyler KM, de Almeida LG, Ortiz MF, Chiurillo MA, de Moraes MH, Cunha OL, Mendonça-Neto R, Silva R, Teixeira SM, Murta SM, Sincero TC, Mendes TA, Urmenyi TP, Silva VG, DaRocha WD, Andersson B, Romanha AJ, Steindel M, de Vasconcelos AT, Grisard EC 2014. Genome of the avirulent human-infective Trypanosome - *Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3176.
- Stoeck T, Schwarz MV, Boenigk J, Schweikert M, von der Heyden S, Behnke A 2005. Cellular identity of an 18S rRNA gene sequence clade within the class Kinetoplastea: the novel genus *Actuariola* gen. nov. (Neobodonida) with description of the type species *Actuariola framvarensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2623-2635.
- 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.
- Sturm NR, Martinez LLIT, Thomas S 2008. Kinetoplastid genomics: the thin end of the wedge. *Infect Genet Evol* 8: 901-906.
- Suarez AK, Tsutsui ND 2004. The value of museum collections for research and society. *Bioscience* 54: 66-73.

- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 21: 2045-2050.
- Taib N, Mangot JF, Domaizon I, Bronner G, Debroas D 2013. Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: new insights into the freshwater protist diversity. *PLoS ONE* 8: e58950.
- 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.
- Thomas S, Westenberger SJ, Campbell DA, Sturm NR 2005. Intragenomic spliced leader RNA array analysis of kinetoplastids reveals unexpected transcribed region diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 352: 100-108.
- Truc P, Büscher P, Cuny G, Gonzatti MI, Jannin J, Joshi P, Juyal P, Lun ZR, Mattioli R, Pays E, Simarro PP, Teixeira MM, Touratier L, Vincendeau P, Desquesnes M 2013. Atypical human infections by animal trypanosomes. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2256.
- Týč J, Votýpka J, Klepetková H, Šuláková H, Jirků M, Lukeš J 2013. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity. *Mol Phylogenet Evol* 69: 255-264.
- Vaerewijck MJ, Sabbe K, Baré J, Houf K 2008. Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants. *Appl Environ Microbiol* 74: 5741-5749.
- van Hannen EJ, Zwart G, van Agterveld MP, Gons HJ, Ebert J, Laanbroek HJ 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl Environ Microbiol* 65: 795-801.
- Vickerman K 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans (eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 1-34.
- Vickerman K 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-1331.
- Vickerman K, Preston TM 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans (eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 35-130.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CSA, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG 2009. Evolutionary history of trypanosomes from South American Caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Int J Parasitol* 40: 345-355.
- Von der Heyden S, Cavalier-Smith T 2005. Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid diversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Bodo* diversity. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2605-2621.
- Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov D, Lukeš J, Yurchenko V 2015a. Systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re-) description. *Trends Parasitol* 31: 460-469.
- Votýpka J, Klepetková H, Jirků M, Kment P, Lukeš J 2012. Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. *Int J Parasitol* 42: 489-500.
- 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, Maslov DA, Yurchenko V, Jirků M, Kment P, Lun ZR, Lukeš J 2010. Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal. *Mol Phylogenet Evol* 54: 243-253.
- Votýpka J, Rádová J, Skalický T, Jirků M, Jirsová D, Mihalca AD, D'Amico G, Petrželková KJ, Modrý D, Lukeš J 2015b. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* doi:10.1016/j.ijpara.2015.06.005.
- 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.
- Weinstock GM 2013. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 489: 250-256.
- 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.
- Wilfert L, Longdon B, Ferreira AG, Bayer F, Jiggins FM 2011. Trypanosomatids are common and diverse parasites of *Drosophila*. *Parasitology* 138: 858-865.
- Wyatt KB, Campos PF, Gilbert MT, Kolokotronis SO, Hynes WH, Desalle R, Ball SJ, Daszak P, MacPhee RD, Greenwood AD 2008. Historical mammal extinction on Christmas Island (Indian Ocean) correlates with introduced infectious disease. *PLoS ONE* 3: e3602.
- 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, 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, Lukeš J, Tesařová M, Jirků M, Maslov DA 2008. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. *Protist* 159: 99-114.
- Zádková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M 2012. Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect Genet Evol* 12: 102-112.