

TARCILLA CORRENTE BORGHESAN

**Diversidade e Filogenia de
tripanossomatídeos
parasitas de dípteros**

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Trypanosomatidae

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

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

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

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

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

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

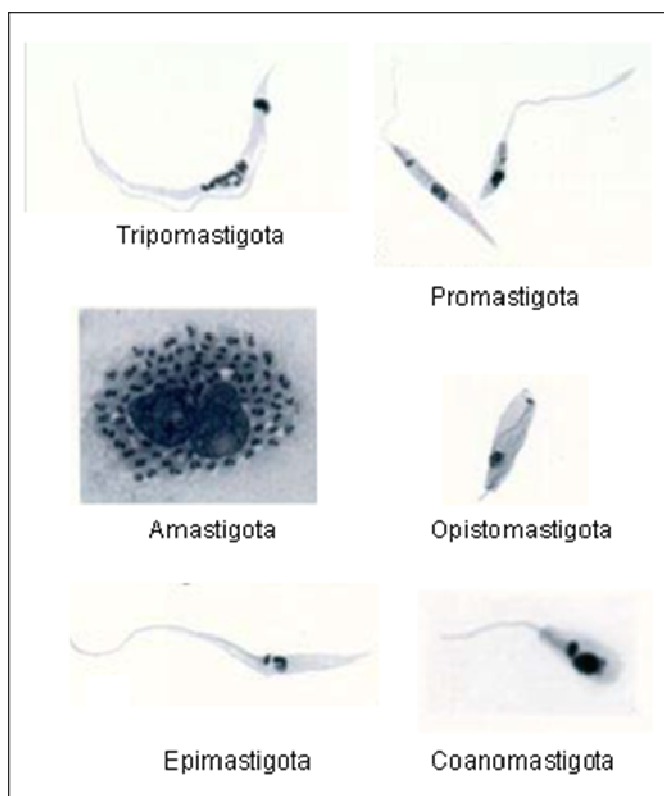


Figura 1. Estágios morfológicos encontrados na família Trypanosomatidae (modificada: de Souza W, 2002)

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

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

1.2 Filogenia e taxonomia de tripanossomatídeos parasitas de insetos

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

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

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

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

