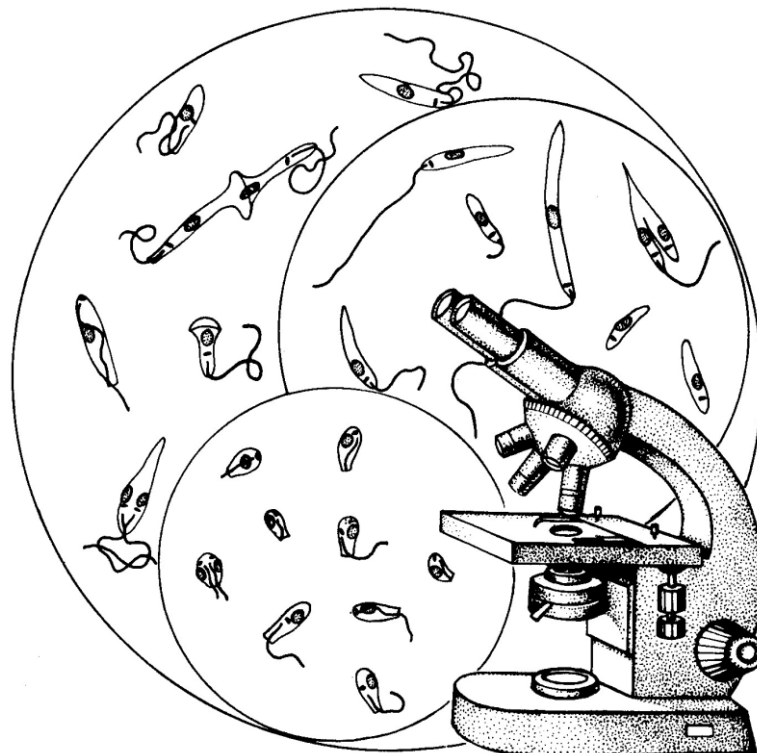


Maria Auxiliadora de Sousa

**TRIPANOSOMATÍDEOS DE INSETOS E PLANTAS:
ANÁLISE DO CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO E
DIVISÃO CELULAR, BIOMETRIA
E FENÔMENOS SUGESTIVOS DE SEXUALIDADE.
VALOR TAXONÔMICO**

**Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ
Rio de Janeiro, Brasil
2000**



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**



Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

SOUSA, Maria Auxiliadora de

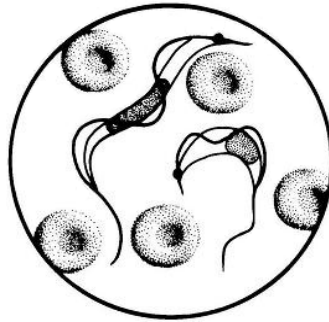
Tripanosomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade; valor taxonômico/Maria Auxiliadora de Sousa. - Rio de Janeiro, 2000.

xix, 161 p., il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, FIOCRUZ.

1. Protozoários. 2. Kinetoplastida. 3. Trypanosomatidae. 4. Taxonomia. 5. Nomenclatura. 6. Biologia. 7. Morfologia. 8. Diferenciação celular. 9. Divisão. 10. Morfometria. 11. Sexualidade. 12. *Crithidia*. 13. *Wallaceina*. 14. *Angomonas*. 15. *Angiomonas*. 16. *Strigomonas*. 17. *Herpetomonas*. 18. *Leptomonas*. 19. *Cercoplasma*. 20. *Phytomonas*. I. Título.

CDD 593.1



Trabalho realizado na
Coleção de Tripanosomatídeos
Departamentos de Protozoologia e Entomologia
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ
Rio de Janeiro, BRASIL

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Tese submetida à Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação
do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do
Grau de Doutor em Biologia Parasitária
Área de Concentração: Protozoologia
Orientador: Reginaldo P. Brazil

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ângela Hampshire C. S. Lopes (UFRJ)
Dr. Artur da Silveira Pinto (UFMG)
Dr. João Evangelista Fiorini (UNIFENAS)
Dr. Maurílio José Soares (IOC, FIOCRUZ)
Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira (IOC, FIOCRUZ)

DEDICATÓRIAS

À minha mãe,
ao **meu pai** (*in memoriam*),
ao Márcio,
ao Daniel e Juliana,
aos meus entes queridos.

À tia Thereza.

Ao Dr. **Gilberto de Freitas**, a quem devo o ingresso na
carreira de pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz.

À Protozoologia.

*“E eu vos digo que a vida realmente é escuridão,
exceto quando há um impulso.*

E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.

... E o que é trabalhar com amor? ...

... É pôr em todas as coisas que fazeis um sopro de vossa alma”...

Gibran Khalil Gibran

("O Profeta" - 1927)

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oswaldo Cruz, na figura de seus diretores e vice-diretores no período 1993-2000, pelo apoio na organização e consolidação da *Coleção de Tripanosomatídeos*, cujo acervo propiciou a realização deste trabalho, um sonho meu...

À **Dra Maria José P. Deane** (*in memoriam*) e ao **Dr. Reginaldo Peçanha Brazil**, pelo apoio e amizade.

Ao **Dr. Wladimir Lobato Paraense**, pela amizade e apoio à minha carreira, além da sempre paciente revisão do inglês da maioria dos artigos científicos que escrevi.

Aos colegas do Departamento de Entomologia, **Ricardo Lourenço de Oliveira, Mariângela Ziccardi, Tereza Fernandes da Silva Nascimento, Márcia Gonçalves de Castro, Monique Albuquerque Motta, Teresa Cristina Monte Gonçalves**, entre outros, pelos momentos de agradável convívio.

Aos colegas de diversas instituições que gentilmente forneceram as amostras que possibilitaram a abrangência deste estudo.

À **Prof^a Glória Maria Costa Gonçalves** e à acadêmica **Luciana Choeri da Silva Coelho**, pelo acabamento em nanquim das ilustrações apresentadas nesta tese, ao biólogo **Sérgio Barbosa Gonçalves**, pela colaboração em parte dos estudos biométricos, ao **Dr. Adeilton Alves Brandão**, pela tradução dos artigos em alemão e russo utilizados na bibliografia, à **Dra Rachel Chebabo**, pelo auxílio na busca de diversas referências bibliográficas necessárias a este trabalho, ao **Dr. Álvaro Bertho**, pela operação do equipamento de citometria de fluxo para a clonagem de algumas amostras de tripanosomatídeos.

Aos estudantes de iniciação científica (PIBIC/FAPERJ) e demais pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram neste trabalho.

*Meus agradecimentos especiais aos estudantes e biólogos
da Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz*

Barbara Neves dos Santos

Cláudia de Sá Xavier Monteiro

Dayse Cristina Britto Branco

Sheila Medeiros dos Santos Pereira

*pela inestimável colaboração neste trabalho
e pela paciência de repetir e repetir..
na busca de uma inalcançável perfeição.*

Agradecimentos especiais também aos meus grandes Mestres, entre eles, **Cecil A. Hoare**, **Franklin G. Wallace** (*in memoriam*) e **Keith Vickerman**, pelos seus importantes trabalhos e revisões sobre os Protozoários/Cinetoplastídeos/Tripanosomatídeos, que possibilitaram o resgate do elo entre o passado e o presente no conhecimento destes organismos.

RESUMO

Tripanosomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade. Valor taxonômico.

Neste trabalho, cinquenta amostras de tripanosomatídeos de insetos e plantas foram analisadas comparativamente por técnicas parasitológicas clássicas, com os seguintes objetivos: conhecer suas características biológicas, morfológicas e biométricas, identificar marcadores de valor diagnóstico, classificá-las em grupos com base em suas similaridades, além de rever questões taxonômicas. Todas as amostras foram cultivadas à temperatura de ~27,3°C em meio LIT, ou este com 20% de soro para permitir o estudo das espécies fastidiosas. As análises foram feitas em intervalos de 24 h, entre 48–144 h de cultivo, visando a avaliação quantitativa do crescimento de cada amostra e o preparo de esfregaços corados pelo Giemsa para estudos ao microscópio óptico (1.000×). Estes incluíam a determinação dos percentuais de cada estágio evolutivo e suas dimensões, das taxas dos tipos de divisão celular, como também a pesquisa de formas ou pares peculiares sugestivos de sexualidade.

Com exceção de três amostras, que precisam de análises complementares, as demais puderam ser classificadas em catorze grupos (morfofiodemas), sete dos quais foram identificados com gêneros já propostos, com uma revisão de sua diagnose: *Crithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Herpetomonas* (*sensu* Prowazek), *Cercoplasma* e *Phytomonas*.

Para melhor definir o complexo padrão de diferenciação celular das amostras com a forma coanomastigota, denominamos procoanomastigotas, paracoanomastigotas e metacoanomastigotas, respectivamente, aqueles estágios com cinetoplasto ante-, para- e posnuclear, e denominamos endocoanomastigotas aquelas formas com o flagelo intracelular curvado. No gênero *Angomonas*, predominaram as metacoanomastigotas (médias > 55,0%) e, em *Wallaceina*, as endocoanomastigotas (médias > 50,0%). Já nas espécies de *Crithidia*, estes dois estágios foram ausentes ou encontrados em taxas médias ≤ 2,3%, enquanto as pequenas coanomastigotas aflageladas, livres ou aderidas ente si (haptomonas), revelaram-se marcadores auxiliares importantes para a identificação deste gênero. Em *Strigomonas*, predominaram as paracoanomastigotas, mas as endocoanomastigotas e haptomonas aflageladas foram ausentes, enquanto as metacoanomastigotas ocorreram em taxas médias baixas (~5,0%).

O gênero *Herpetomonas*, conforme identificado por quase um século, na realidade contem uma mistura de táxons. Com base em descrições e ilustrações de diversos autores pioneiros, apenas a chamada *H. muscarum ingenoplastis* foi considerada semelhante à espécie-tipo (*H. muscarum*), apresentando promastigotas avantajadas, usualmente biflageladas, com cinetoplasto volumoso e peculiar. As demais espécies identificadas como *Herpetomonas* são muito distintas e sua classificação precisa ser revista.

Confirmamos a grande diversidade das amostras identificadas como *Leptomonas*, classificando-as em sete grupos. Por conta das incertezas sobre a autenticidade da espécie-tipo (*L. bütschlii*), é difícil afirmar se alguma das amostras estudadas poderia ser classificada como *Leptomonas*. Entretanto, observamos que duas espécies cistogênicas isoladas de hemípteros fitófagos apresentavam similaridade morfológica com *L. jaculum*, a primeira espécie encontrada em inseto identificada neste gênero. Somente a singular "*L.*" *mirabilis* pôde ser associada a um gênero anteriormente proposto (*Cercoplasma*), no qual já havia sido classificada. Esta espécie, sugerida como referência, apresenta uma complexa combinação de caracteres, destacando-se a ocorrência de formas espiraladas "gigantes" (70–200µm), as quais são de grande valor diagnóstico.

As espécies de *Phytomonas* basicamente apresentam promastigotas e formas espiraladas em percentuais variáveis. Contudo, elas podem ser facilmente distinguidas por, pelo menos, dois caracteres: formas aflageladas alongadas, livres nas culturas e usualmente menores que as flageladas, além de um tipo peculiar de divisão que origina duas células com flagelos de tamanhos muito diferentes, ou uma forma flagelada e outra não.

No presente estudo, evidenciamos que a divisão celular também pode originar estágios distintos, além de multiplicar formas altamente diferenciadas. Confirmamos que estágios com cinetoplasto posnuclear ou com flagelo intracelular curvado, além das formas espiraladas, não são exclusivas de apenas um gênero na família Trypanosomatidae. Formas e pares peculiares, previamente descritos como sugestivos de etapas de um processo de sexualidade, também foram observados em *Crithidia*, *Leptomonas* e *Phytomonas*, mas principalmente nas chamadas *Herpetomonas*, nas quais possíveis eventos de migração e fusão de núcleos foram mais frequentes.

Nossos estudos confirmaram que é possível identificar e classificar tripanosomatídeos por técnicas parasitológicas clássicas, considerando o conjunto de seus caracteres, preferencialmente conhecidos por análises em condições experimentais padronizadas e incluindo amostras de referência.

ABSTRACT

Trypanosomatids from insects and plants: growth, cellular differentiation and division, biometry, and phenomena suggesting sexuality. Taxonomic value.

In this study, fifty trypanosomatid isolates from insect and plants were comparatively analyzed by classic parasitological techniques with intend to know their biological, morphological, and biometric features, to group them according their similarities, to identify characters with diagnostic value, as well as to review taxonomic questions. The isolates were grown at ~27.3°C in "liver infusion tryptose" (LIT) medium or LIT with 20% fetal calf serum (LIT 20%), the latter to enable the growth of the fastidious isolates. All isolates were analyzed between 48–144 h of cultivation, at 24 h intervals, to evaluate their growth rates, and to prepare Giemsa stained smears for studies under optical microscope (1,000×). The measures and the percent of each developmental stage and the division types were determined. Peculiar cells and pairs suggesting steps of a sexual phenomenon were also searched.

With of exception three species, which are awaiting further analyses, the trypanosomatids under study were classified in fourteen groups (morphobiodemes), seven of them being identified with previously named genera, whose diagnose was reviewed in the present study: *Crithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Herpetomonas* (*sensu* Prowazek), *Cercoplasma* e *Phytomonas*.

Aiming to better define the complex differentiation pattern found in the choanomastigote-shaped trypanosomatids, we proposed the names prochoanomastigote, parachoanomastigote and metachoanomastigote, respectively, to those stages having ante-, para- and postnuclear kinetoplast, besides the name endochoanomastigote to those forms with internal bent flagellum. In *Angomonas* genus, the metachoanomastigotes were the predominant forms (mean > 55.0%), whereas in *Wallaceina* predominated the endochoanomastigotes (mean > 50.0%). *Crithidia* species did not present these two stages or they were seen at low mean rates ($\leq 2.3\%$). However, their small choanomastigotes, mainly aflagellates, either free or adhered to each other (haptomonads), were helpful markers for their identification. In *Strigomonas*, the parachoanomastigotes predominated, the endochoanomastigotes and aflagellate haptomonads were absent, and the metachoanomastigotes occurred at low mean rate (~5.0%).

The *Herpetomonas* genus, as it has been identified by nearly one century, actually contains a mixture of taxa. Based on descriptions and illustrations from several pioneering authors, only the so-called *H. muscarum ingenoplastis* is similar to the type-species of this genus (*H. muscarum*), presenting very large promastigotes, mainly biflagellates, with a great and peculiar kinetoplast. The others species identified as *Herpetomonas* are very distinct from *H. m. ingenoplastis*, and their generic classification needs revision.

The great diversity of the species identified in the *Leptomonas* genus was confirmed, and they were classified into seven groups. Accounting the uncertainties about the authenticity of the type-species (*L. bütschlii*), it is difficult to know if any species studied herein could be classified as *Leptomonas*. However, it is noteworthy that two cystogenic isolates from phytophagous hemiptera presented morphological similarity with the first insect trypanosomatid classified in this genus (*L. jaculum*). Solely *L. mirabilis* could be associated to a previously reported genus (*Cercoplasma*), in which it was already been placed. This species is suggested as reference, and it presents a very complex combination of features, among them the "giant" twisted forms (70–200µm), which are of great diagnostic value.

The *Phytomonas* species basically present promastigotes and a variable percent of twisted cells. However, at least, two features could easily distinguish them: their elongated aflagellate forms, only free in cultures, usually smaller than the flagellate ones, and their peculiar division process, which gives rise either to two cells with very different flagellum size, or one having flagellum and the other not.

In the present study, it was evidenced that the cellular division can also generate distinct stages, besides multiplying highly differentiated forms. It was also confirmed that stages with postnuclear kinetoplast, internal bent flagellum, and the twisted cells are not exclusive from a single genus of the Trypanosomatidae family. Peculiar cells and pairs, previously described as suggestive steps of a sexual phenomenon, were also found in *Crithidia*, *Leptomonas* e *Phytomonas* species, but mainly in the so-called *Herpetomonas*, which more frequently displayed possible events of migration and fusion of nuclei.

Our studies confirmed that it is possible to identify and classify trypanosomatids by classical parasitological approaches, taking into account their set of features, these rather known by analyses under standardized experimental conditions, and including reference strains.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanosomatídeos: posição taxonômica, hospedeiros e importância.....	1
1.2. Características gerais dos tripanosomatídeos.....	2
1.3. Estágios evolutivos encontrados em tripanosomatídeos.....	3
1.4. Gêneros da família Trypanosomatidae.....	6
1.4.1. Gêneros monoxênicos.....	6
1.4.2. Gêneros heteroxênicos.....	8
1.5. Histórico: primeiros relatos sobre tripanosomatídeos.....	9
1.6. O estudo dos tripanosomatídeos e sua taxonomia até a década de 60.....	11
1.7. Outras técnicas de estudo dos tripanosomatídeos.....	13
1.7.1. Análises ultraestruturais.....	13
1.7.2. Análises por técnicas sorológicas.....	13
1.7.3. Análises fenotípicas por técnicas bioquímicas.....	14
1.7.4. Análises genotípicas.....	15
1.7.5. Análises computacionais de dados bioquímicos e moleculares.....	17
1.8. Justificativas para o presente trabalho.....	18
1.9. Objetivos deste trabalho.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Amostras analisadas.....	23
2.2. Meios de cultura utilizados.....	23
2.3. Clonagem de amostras.....	25
2.4. Análise do crescimento em meio LIT ou LIT 20% SFB.....	25
2.5. Coloração dos parasitas.....	25
2.6. Diferenciação e divisão celular em meio LIT ou LIT 20% SFB.....	26
2.7. Análise morfológica dos diferentes estágios evolutivos.....	27
2.8. Pesquisa de formas e pares peculiares sugestivos de fenômenos de sexualidade.....	28
3. RESULTADOS	35
3.1. Crescimento em LIT ou LIT 20% SFB de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros.....	35
3.2. Diferenciação celular em LIT ou LIT 20% SFB de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros.....	36
3.2.1. Diferenciação celular em tripanosomatídeos com a forma coanostigota e classificados em diferentes gêneros.....	36
3.2.2. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificados no gênero <i>Herpetomonas</i>	39
3.2.3. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificados no gênero <i>Leptomonas</i>	40
3.2.4. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificados no gênero <i>Phytomonas</i>	42
3.2.5. Diferenciação celular em tripanosomatídeos apossimbióticos e " <i>Herpetomonas</i> " <i>dedonderi</i>	43
3.3. Divisão celular em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros.....	48
3.3.1. Divisão celular considerando a posição dos núcleos.....	49
3.3.2. Divisão celular considerando a posição dos cinetoplastos e o curso intracelular do flagelo.....	49
3.4. Análise morfológica de estágios evolutivos encontrados em tripanosomatídeos de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros.....	75

3.4.1. Análise morfométrica de estágios flagelados com cinetoplasto antenuclear.....	75
3.4.2. Análise morfométrica de estágios flagelados com cinetoplasto paranuclear.....	77
3.4.3. Análise morfométrica de estágios sem flagelo livre e com cinetoplasto ante- ou paranuclear.....	79
3.4.4. Análise morfométrica de "cistos" flagelares encontrados em tripanosomatídeos classificados no gênero <i>Leptomonas</i>	80
3.4.5. Análise morfométrica de estágios com cinetoplasto posnuclear encontrados em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.....	81
3.4.6. Análise morfométrica de endomastigotas e endocoanomastigotas em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.....	82
3.4.7. Variabilidade morfométrica durante crescimento em cultura em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.....	83
3.5. Fenômenos sugestivos de sexualidade em tripanosomatídeos isolados de insetos e plantas e classificados em diferentes gêneros.....	96
4. DISCUSSÃO	103
4.1. Análise biológica, morfológica e bioemétrica de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas: importância para a sua taxonomia.....	103
4.2. Questões de nomenclatura analisadas em algumas espécies e um gênero.....	106
4.3. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e que apresentam a forma coanomastigota.....	107
4.4. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e previamente identificados como <i>Herpetomonas</i>	113
4.5. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos e previamente identificados como <i>Leptomonas</i>	116
4.6. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de plantas e previamente identificados como <i>Phytomonas</i>	120
4.7. Propostas de revisão da diagnose de alguns gêneros da família Trypanosomatidae.....	123
4.7.1. Gênero <i>Crithidia</i> Léger, 1902 (<i>sensu</i> Novy <i>et al.</i> 1907 e Wallace 1943)	124
4.7.2. Gênero <i>Wallaceina</i> (Podlipaev <i>et al.</i> , 1990) (= <i>Proteomonas</i>).....	125
4.7.3. Gênero <i>Angomonas</i> Sousa & Côrte-Real, 1991 (= <i>Angomonas</i>).....	126
4.7.4. Gênero <i>Strigomonas</i> Lwoff & Lwoff, 1931 (revisto).....	127
4.7.5. Gênero <i>Herpetomonas</i> Kent, 1880 (<i>sensu</i> Prowazek 1904) (revisto).....	128
4.7.6. Gênero <i>Cercoplasma</i> Roubaud, 1911 (revisto).....	129
4.7.7. Gênero <i>Phytomonas</i> Donovan, 1909 (revisto).....	130
4.8. Fenômenos sugestivos de sexualidade em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas.....	133
5. CONCLUSÕES	136
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
7. ANEXOS	
7.1 Artigos científicos publicados e relacionados aos temas da tese (1994-2000)	
7.1.1 Sousa MA 1994. Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in <i>Herpetomonas megaseliae</i> (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). <i>Parasitol Res</i> 80: 112-116	
7.1.2 Sousa MA 1994. Trypomastigotes in cultures of <i>Blastocrithidia culicis</i> (Novy, MacNeal & Torrey 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 89: 111-112	
7.1.3 Sousa MA 1997. Cytological findings suggesting sexuality in <i>Phytomonas davidi</i> (Protozoa: Kinetoplastida). <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 92: 165-170	
7.1.4 Sousa MA, Pereira MCS, Chebabo R, Brazil RP 1997. Morphological features suggesting a sexual process in a trypanosomatid of the genus <i>Herpetomonas</i> . <i>Eur J Protistol</i> 33: 356-359	

- 7.1.5 Sousa MA, Pereira MCS, Côrte-Real S 1997. *Leishmania major*: parasite interactions suggesting sexuality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 761-766
- 7.1.6 Sousa MA 1999. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I): 205-210
- 7.1.7 Brandão AA, Miranda A, Degraive WM, Sousa MA 2000. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Res* 86: 809-812
-
- 7.2 Ultraestrutura de *Angomonas deanae* Sousa & Côrte-Real, 1991 (= *Angiomonas deanei*)
-
- 7.3 Abstracts publicados em periódicos e relacionados aos temas abordados na tese
-
- 7.3.1 Sousa *et al.* 1994. Differentiation to opisthomastigote in trypanosomatids allocated in the genus *Crithidia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl. I): 224
- 7.3.2 Sousa *et al.* 1994. Molecular karyotype of lower trypanosomatids: genus *Crithidia*. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 89 (Suppl. I): 253
- 7.3.3 Sousa *et al.* 1995. Characterization of a trypanosomatid isolated from *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (Suppl. I): 246
- 7.3.4 Camargo *et. al.* 1996. On the polymorphism of *Herpetomonas dedonderi* Dedet *et al.*, 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl.): 93
- 7.3.5 Sousa *et al.* 1996. Molecular karyotype analysis of lower trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl.): 102
- 7.3.6 Sousa *et al.* 1997. *Herpetomonas* from plants and phytophagous hemipterans: are some *Herpetomonas* spp. heteroxeneous? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl. I): 130
- 7.3.7 Sá-Xavier *et al.* 1998. A new trypanosomatid belonging to the genus *Crithidia* isolated from *Zelus leucogrammus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 95
- 7.3.8 Sousa *et al.* 1998. Cellular differentiation and growth in axenic culture of trypanosomatids allocated in the genus *Leptomonas* (Protozoa: Kinetoplastida). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 100
- 7.3.9 Sousa *et al.* 1998. Characterization of a *Herpetomonas* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Nectomys squamipes* (Mammalia: Rodendia). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 101
- 7.3.10 Sousa *et al.* 1998. *Leptomonas* sp. isolated from *Lutzomyia ayrozai* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 127
- 7.3.11 Sousa *et al.* 1998. Cellular differentiation in trypanosomatids isolated from plants: usefulness of morphological characters to identify *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 221-222
- 7.3.12 Sousa *et al.* 1998. The *Leptomonas* genus analysed by morphobiological parameters: taxonomic implications. *Phytomonas Newsletters* 18: 4
-
- 7.4 Trabalhos pioneiros (parte das ilustrações ou do texto)
-
- 7.4.1 Novy FG, MacNeal WJ, Torrey HN 1907. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J Infect Dis* 4: 223-276 (ilustrações de *Crithidia fasciculata*, formas de cultura)
- 7.4.2 Wenyon CM 1926. *Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists*, vol. 1, Baillière, Tindall & Cox, London (*Herpetomonas muscarum* original)
- 7.4.3 Swellengrebel NH 1911. Note on the morphology of *Herpetomonas* and *Crithidia*, with some remarks on "physiological degeneration". *Parasitology* 4: 108-130 ("*Crithidia*" *calliphorae*)
- 7.4.4 Roubaud E 1912. Phénomènes autogamiques et formes trypanosomiennes chez quelques flagellés de Muscides Africains. *C R Soc Biol* 72: 552-554 (estágios de opistomastigotas, *Herpetomonas*)
- 7.4.5 Lafont 1910. Sur la présence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des Flagellés, dans le latex de trois Euphorbiacées. *Ann Inst Pasteur* 24: 204-219 (ilustração de *Phytomonas davidi*)
- 7.4.6 França 1920. La flagellose des Euphorbes (II). *Ann Inst Pasteur* 34: 432-465 (*Phytomonas davidi*)
- 7.4.7 Stahel G 1931. Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (ploëmmekrose) des kaffeebaumes in Surinam. Mikroskopische untersuchungen und infektionsversuche. *Phytopathol Z* 4: 65-82 (*Phytomonas leptovasonum*)
-

LISTA DE TABELAS

NÚMERO	DESCRIÇÃO	Págs
Tabela I	Tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota identificados como <i>Crithidia</i> (hospedeiro, procedência, número código, referências bibliográficas).	29
Tabela II	Tripanosomatídeos (isolados de insetos ou plantas) que apresentam a forma coanomastigota classificados em diferentes gêneros (hospedeiro, procedência, número código, referências bibliográficas).	30
Tabela III	Tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e identificados como <i>Herpetomonas</i> (hospedeiro, procedência, número código, referências bibliográficas).	31
Tabela IV	Tripanosomatídeos isolados de insetos e classificados no gênero <i>Leptomonas</i> (hospedeiro, procedência, número código, referências bibliográficas).	32
Tabela V	Tripanosomatídeos isolados de plantas e identificados como <i>Phytomonas</i> (hospedeiro, procedência, número código, referências bibliográficas).	33
Tabela VI	Crescimento e diferenciação celular em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota e classificados em diferentes gêneros.	44
Tabela VII	Crescimento e diferenciação celular em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados no gênero <i>Herpetomonas</i> .	45
Tabela VIII	Crescimento e diferenciação celular em tripanosomatídeos isolados de insetos e classificados no gênero <i>Leptomonas</i> .	46
Tabela IX	Crescimento e diferenciação celular em tripanosomatídeos isolados de plantas e classificados no gênero <i>Phytomonas</i> .	47
Tabela X	Divisão celular em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota e classificados em diferentes gêneros.	51
Tabela XI	Divisão celular em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados no gênero <i>Herpetomonas</i> .	52
Tabela XII	Divisão celular em tripanosomatídeos isolados de insetos e classificados no gênero <i>Leptomonas</i> .	53
Tabela XIII	Divisão celular em tripanosomatídeos isolados de plantas e classificados no gênero <i>Phytomonas</i> .	54
Tabela XIV	Morfometria de células flageladas (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota e classificados em diferentes gêneros.	84
Tabela XV	Morfometria de células flageladas (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados no gênero <i>Herpetomonas</i> .	85

Tabela XVI	Morfometria de células flageladas (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) em tripanosomatídeos isolados de insetos e classificados no gênero <i>Leptomonas</i> .	86
Tabela XVII	Morfometria de diferentes tipos de promastigotas flageladas encontrados em <i>Leptomonas</i> cystogênicas.	87
Tabela XVIII	Morfometria de células flageladas em tripanosomatídeos isolados de plantas e classificados no gênero <i>Phytomonas</i> .	88
Tabela XIX	Morfometria de células sem flagelo livre (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) encontradas em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota e classificados em diferentes gêneros.	89
Tabela XX	Morfometria de células sem flagelo livre (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) encontradas em tripanosomatídeos isolados de insetos e classificados no gênero <i>Leptomonas</i> .	90
Tabela XXI	Morfometria de células sem flagelo livre encontradas em tripanosomatídeos isolados de plantas e classificados no gênero <i>Phytomonas</i> .	91
Tabela XXII	Morfometria de "cistos" flagelares encontrados em tripanosomatídeos classificados no gênero <i>Leptomonas</i> .	92
Tabela XXIII	Morfometria de células com cinetoplasto posnuclear (com ou sem flagelo livre) encontradas em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.	93
Tabela XXIV	Morfometria de endomastigotas e endocoanomastigotas (com ou sem flagelo livre) encontradas em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.	94
Tabela XXV	Variabilidade morfométrica durante o cultivo: tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros.	95
Tabela XXVI	Fenômenos sugestivos de sexualidade em tripanosomatídeos de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros.	98
Tabela XXVII	Caracterização e classificação de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas.	131
Tabela XXVIII	Caracterização e classificação de tripanosomatídeos previamente identificados como <i>Leptomonas</i> e isolados de insetos.	132

LISTA DE FIGURAS

NÚMERO	DESCRIÇÃO	PÁGS
Figura 1	Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma promastigota.	20
Figura 2	Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota.	21
Figura 3	Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos dos gêneros <i>Blastocrithidia</i> e <i>Trypanosoma</i> .	22
Figura 4	Representação esquemática dos tipos de divisão que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota.	34
Figura 5	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Crithidia fasciculata</i> (cepas <i>Anopheles</i> e <i>Culex</i>), <i>C. guilhermei</i> e <i>C. luciliae</i> .	55
Figura 6	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Crithidia ricardoï</i> (amostra original e clone 1A).	56
Figura 7	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Crithidia</i> sp. (C.t.) isolada de <i>Chamaesyce thymifolia</i> (amostra original) e <i>C. flexonema</i> (clone 7E).	57
Figura 8	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Crithidia mellificae</i> , <i>C. hutneri</i> e <i>Crithidia</i> sp. (Z.I.) isolada de <i>Zelus leucogrammus</i> (clone 6G).	58
Figura 9	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Crithidia luciliae thermophila</i> , <i>C. hamosa</i> e <i>C. acanthocephali</i> .	59
Figura 10	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Wallaceina inconstans</i> (clone 4C) e <i>W. brevicula</i> (clone 11E) (= <i>Proteomonas</i>)	60
Figura 11	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Angomonas deanae</i> (= <i>A. deanei</i>), " <i>C. desouzai</i> " e " <i>Herpetomonas</i> " <i>roitmani</i> (amostras com endossimbionte); gênero <i>Angomonas</i>	61
Figura 12	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em " <i>Crithidia</i> " <i>oncopelti</i> (com endossimbionte); gênero <i>Strigomonas</i> .	62
Figura 13	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em " <i>Herpetomonas</i> " <i>dedonderi</i> (amostra original) em diferentes horas de cultivo.	63
Figura 14	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Herpetomonas pessoai</i> (= <i>H. samuelpessoai</i>), <i>H. anglusteri</i> , <i>H. mariadeanei</i> e <i>H. megaseliae</i> .	64
Figura 15	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Herpetomonas muscarum muscarum</i> e <i>H. muscarum ingenoplastis</i> .	65
Figura 16	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Herpetomonas davidi</i> (isolado de McGhee & Postell, 1976), <i>Herpetomonas</i> spp. isoladas de <i>Euphorbia hyssopifolia</i> (E.h.), <i>Solanum lycopersicum</i> (S.l.) e <i>Leptoglossus stigma</i> (L.s.).	66
Figura 17	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados nas chamadas <i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) (amostra IM3943, clone 1) e <i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) (amostra IM3944, clone 1) isoladas de <i>Lutzomyia ayrozai</i> .	67
Figura 18	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como <i>Leptomonas pyrrocoris</i> , <i>L. seymouri</i> , <i>L. collosoma</i> e <i>L. costoris</i> .	68
Figura 19	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como <i>Leptomonas samueli</i> , <i>L. lactosovorans</i> e <i>L. mirabilis</i> .	69
Figura 20	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados na chamada <i>Leptomonas pulexsimulantis</i> .	70

Figura 21	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como <i>Leptomonas wallacei</i> (clone B) e <i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) isolada de <i>Oncopeltus varicolor</i> (amostra 36/429 TD).	71
Figura 22	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Phytomonas serpens</i> (amostra 9T), <i>Phytomonas</i> sp. (C.b.) isolada de <i>Citrus bergamia</i> , <i>P. macgheeii</i> e <i>Phytomonas</i> sp. (A.c.) isolada de <i>Allamanda cathartica</i> .	72
Figura 23	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) isolada de <i>Euphorbia pinea</i> (amostra EM1) e <i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) isolada de <i>E. characias</i> (amostra EC2).	73
Figura 24	Desenhos em câmara clara de estágios evolutivos encontrados em <i>Phytomonas francai</i> e <i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) isolada de <i>Jathropa macrantha</i> .	74
Figura 25	Desenhos em câmara clara de pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em <i>Crithidia fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>), <i>C. guilhermei</i> , <i>C. flexonema</i> (clone 7E), <i>C. hutneri</i> , <i>C. luciliae thermophila</i> e <i>C. hamosa</i> .	99
Figura 26	Desenhos em câmara clara de pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em <i>Herpetomonas pessoai</i> (= <i>H. samuelpessoai</i>), <i>H. megaseliae</i> , <i>H. muscarum muscarum</i> e <i>H. mariadeanei</i> .	100
Figura 27	Desenhos em câmara clara de pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em <i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) isolada de <i>Euphorbia hyssopifolia</i> , <i>H. davidi</i> (isolado de McGhee & Postell, 1976) e <i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) isolada de <i>Solanum lycopersicum</i> . Estágio em divisão binária longitudinal apresentado para comparação.	101
Figura 28	Desenhos em câmara clara de pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em <i>Leptomonas pyrrocoris</i> , <i>L. wallacei</i> (clone B), <i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) isolada de <i>Oncopeltus varicolor</i> , <i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) isolada de <i>Euphorbia pinea</i> e <i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) isolada de <i>E. characias</i> . Estágios em divisão binária longitudinal apresentados para comparação.	102
Figura 29	Representação esquemática de propostas de seqüências de eventos para os achados sugestivos de sexualidade em espécies identificadas como <i>Herpetomonas</i> , além de <i>Crithidia</i> , <i>Leptomonas</i> e <i>Phytomonas</i> .	134
Figura 30	Representação esquemática de propostas de seqüências de eventos para os achados sugestivos de sexualidade descritos por Sousa (1997) em <i>Herpetomonas davidi</i> (isolado de McGhee & Postell, 1976).	135

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CT-IOC	Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
LIT	meio de cultura contendo <i>Liver Infusion Tryptose</i> (= LIT básico)
SFB	soro fetal bovino
LIT 20% SFB	meio de cultura LIT (básico) com adicional de 10% de soro fetal bovino
FYTSM	meio de cultura complexo de Roitman <i>et al.</i> , modificado
MWM	meio de cultura de Warren, modificado
N	Normal
M	Molar
U	Unidade
g	Gramma
mg	Miligramma
ml	Mililitro
µl	Microlitro
min	Minuto
h	Hora
q.s.p.	quantidade suficiente para
N=	número de células medidas (tamanho da amostragem)
C	comprimento da célula (sem o flagelo livre)
L	largura da célula (na porção mais larga)
C/L	razão comprimento/largura da célula
F	comprimento do flagelo livre
PN	distância da extremidade posterior ao meio do núcleo
NA	distância do meio do núcleo à extremidade anterior
IN	índice nuclear (PN/NA)
M.O.	microscópio óptico
M.E.	microscópio eletrônico
nDNA	DNA nuclear
kDNA	DNA do cinetoplasto
rDNA	DNA codificador do RNA ribossômico
rRNA	RNA ribossômico
PCR	reação em cadeia da polimerase
RAPD	DNA polimórfico amplificado por PCR utilizando iniciadores aleatórios
AP-PCR	reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores aleatórios
UP-PCR	reação em cadeia da polimerase com iniciadores baseados em seqüências conservadas
RFLPs	fragmentos de DNA obtidos após tratamento com endonucleases de restrição
A.c.	isolado de <i>Allamanda cathartica</i>
C.b.	isolado de <i>Citrus bergamia</i>
C.t.	isolado de <i>Chamaesyce thymifolia</i>
E.c.	isolado de <i>Euphorbia characias</i>
E.h.	isolado de <i>Euphorbia hyssopifolia</i>
E.p.	isolado de <i>Euphorbia pinea</i>
J.m.	isolado de <i>Jathropha macrantha</i>
L.a.	isolado de <i>Lutzomyia ayrozai</i>
L.s.	isolado de <i>Leptoglossus stigma</i>
O.v.	isolado de <i>Oncopeltus varicolor</i>
S.l.	isolado de <i>Solanum lycopersicum</i>
Z.l.	isolado de <i>Zelus leucogrammus</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanosomatídeos: posição taxonômica, hospedeiros e importância

Todos os membros conhecidos da família Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Protozoa: Kinetoplastida) (Levine *et al.* 1980) são parasitas, monoxênicos ou heteroxênicos. No primeiro caso, seu ciclo evolutivo completa-se em um hospedeiro, o qual freqüentemente é um artrópode. No segundo caso, seu ciclo de vida alterna-se entre dois hospedeiros, um vertebrado ou vegetal e um artrópode ou hirudíneo, estes últimos atuando como vetores. Os artrópodes mais comumente descritos como hospedeiros e vetores de tripanosomatídeos são insetos das ordens Diptera e Hemiptera (Wallace 1966, Hoare 1972, McGhee & Cosgrove 1980). Vertebrados de todas as classes podem ser hospedeiros de tripanosomatídeos (*apud* Vickerman 1990), como também vegetais de diversas famílias, entre elas Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae, Urticaceae, Palmae, Compositae, Sapotaceae, Moraceae, Cecropiaceae, Solanaceae (*apud* Wallace *et al.* 1992).

Tripanosomatídeos também têm sido descritos parasitando moluscos, nematódeos, rotíferos ou mesmo o macronúcleo de protozoários ciliados (Grassé 1952, Gilles & Hanson 1963, Wallace 1966, 1979, Nicoli *et al.* 1971a, b, Vickerman 1976, Wille *et al.* 1981, Görtz 1986, Görtz & Dieckermann 1987). Freedman & Hanson (1970) consideram a possibilidade de ciliados infectados atuarem como vetores ou reservatórios de tripanosomatídeos para metazoários. É interessante assinalar que morcegos vampiros podem ser ao mesmo tempo hospedeiros e vetores de alguns tripanosomas da Seção Salivaria, que também inclui espécies que podem ser transmitidas entre vertebrados por inoculação mecânica promovida por moscas hematófagas (gêneros *Tabanus* ou *Stomoxys*) ou diretamente através do coito (Hoare 1972). Verificou-se igualmente a transmissão de tripanosomatídeos de planta a planta através de enxertos (Aragão 1927, Stahel 1931).

Como diversas espécies de tripanosomatídeos são agentes etiológicos de importantes doenças em seres humanos, animais domésticos (leishmanioses e tripanosomíases) e vegetais de interesse econômico (flageloses), seu estudo é de grande relevância para a medicina, veterinária e agropecuária. Assim, estes patógenos, entre eles, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* spp., *Leishmania* spp., são objeto de grande número de investigações pelas mais diferentes abordagens. Entretanto, espécies não patogênicas da família também têm sido muito investigadas. Diversos destes organismos (*Crithidia fasciculata*, *Leishmania tarentolae*, *T. mega*,

etc) têm sido muito utilizados como modelos em estudos biológicos, bioquímicos, moleculares, ultraestruturais, quimioterápicos, entre outros, e também empregados como antígenos para diagnóstico (*C. luciliae*, *C. oncopelti*) ou mesmo ensaiados em animais experimentais como agentes vacinantes contra patógenos, entre eles, *C. fasciculata*, "*Leptomonas pessoai*", *Leptomonas collosoma* e *Blastocrithidia culicis* (Johnson *et al.* 1963, Newton 1968, Simpson 1972, 1987, Souza *et al.* 1974, Takehara & Dias-da-Silva 1976, Vickerman & Preston 1976, Wallace 1979, Englund & Marini 1980, McGhee & Cosgrove 1980, Benne 1990, Béjà *et al.* 1993, Gero 1998, Uttaro *et al.* 1999).

Tripanosomatídeos com características de espécies monoxênicas, ou heteroxênicas sem conhecido efeito patogênico para seres humanos, podem ser encontrados (com frequência ou esporadicamente) e às vezes isolados a partir de indivíduos sadios ou com alguma sintomatologia (Johnson 1933, Hoare 1972, Weinman 1972, McGhee & Cosgrove 1980, D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992, Mebrahtu *et al.* 1992). Nos últimos 10 anos, tripanosomatídeos com características de parasitas de insetos ou mesmo de répteis têm sido isolados de pacientes aidéticos (Sabbatani *et al.* 1991, Dedet *et al.* 1995, Jiménez *et al.* 1996, Pacheco *et al.* 1998, Dedet & Pratlong 2000). Mebrahtu *et al.* (1992) e Sousa *et al.* (1998b) também identificaram organismos com caracteres dos gêneros monoxênicos em outros mamíferos (cão, roedor). Por outro lado, hospedeiros invertebrados de patógenos humanos ou de animais domésticos podem ser também parasitados por tripanosomatídeos monoxênicos ou mesmo heteroxênicos não patogênicos (*e.g.* Hoare 1931, 1972, McConnel 1963, McConnell & Correa 1964, Wallace & Hertig 1968, Ayala 1970, Cerisola *et al.* 1971, Garnham 1971, Minter-Goedbloed *et al.* 1983, 1993, Hoch *et al.* 1986, Ryan *et al.* 1987, D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992, Shaw 1992, Böse & Heister 1993, Sousa *et al.* 1998a, Franco & Grimaldi Jr 1999, Grisard *et al.* 1999, Sousa 1999).

O conjunto de fatos que acabamos de expor ressalta a importância e a necessidade de estudos abrangentes sobre os tripanosomatídeos, entre diversos motivos, para identificar por diferentes abordagens caracteres que auxiliem no diagnóstico diferencial dos membros da família.

1.2. Características gerais dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos constituem um grupo singular de protozoários, compartilhando um conjunto de caracteres, dentre os quais destacam-se: **(a)** a presença de uma massa peculiar de DNA extranuclear (cinetoplasto) localizada próxima ao corpo basal do flagelo, mas contido numa mitocôndria, a qual é única e se estende ao longo da célula, **(b)** a posse de um único flagelo, **(c)** a presença de enzimas da cadeia glicolítica numa organela conhecida como

glicosoma, **(d)** a presença de um citoesqueleto formado por microtúbulos corticais, os quais se mantêm intactos através do seu ciclo evolutivo, **(e)** mudanças de estágios, com alternância ou não de hospedeiros, ao longo do seu ciclo de vida (Wallace 1966, 1979, Vickerman 1976, 1990, 1995).

O cinetoplasto dos tripanosomatídeos consiste de dois tipos de moléculas circulares de DNA (maxicírculos e minicírculos) concatenadas, formando uma rede, conforme vistas ao M.E. (e.g. Riou & Delain 1969, Simpson 1972, Kleisen *et al.* 1975, Riou & Saucier 1979, Barker & Arnot 1981). Por célula, na dependência da espécie, encontram-se 40–50 maxicírculos, cada com 20–38 kb, e cerca de 3.000–27.000 minicírculos, cada com 0,46–6,5 kb (Riou & Saucier 1979, Simpson 1987, Stuart & Feagin 1992, Vickerman 1994, Brandão *et al.* 2000). Os maxicírculos são aparentemente homogêneos em seqüência dentro de uma mesma espécie e têm função semelhante à dos DNAs mitocondriais de outras células eucariontes (Simpson 1987, Stuart & Feagin 1992, Vickerman 1994). Já os minicírculos são heterogêneos em seqüência e sabe-se hoje que podem ser transcritos em pequenas moléculas, RNAs guias (gRNAs), utilizadas como moldes para orientar inserções e deleções de resíduos de uridina em transcritos dos maxicírculos. Este processo, conhecido como "edição" do RNA (*RNA editing*), é peculiar nos cinetoplastídeos quanto ao seu mecanismo (Stuart 1991, Stuart & Feagin 1992, Vickerman 1994). A concatenação dos maxicírculos e minicírculos em rede facilita tanto a segregação do kDNA durante a divisão celular, quanto a aproximação física dos gRNAs e pré-mRNAs, facilitando o processo de edição do RNA (Stuart & Feagin 1992).

Algumas espécies de tripanosomatídeos do gênero *Trypanosoma* (subgênero *Trypanozoon*) podem apresentar mutantes discinetoplásticos, ou seja, sem cinetoplasto visível ao M.O. em preparações coradas pelo Giemsa ou submetidas à reação de Feulgen, embora ao M.E. possa ser detectado kDNA fragmentado e residual (Mühlpfordt 1963, Vickerman 1994). Neste grupo a discinetoplastia não tem efeito letal, como usualmente ocorre em outros tripanosomatídeos (Mühlpfordt 1963).

1.3. Estágios evolutivos encontrados em tripanosomatídeos

Considerando o ponto de emergência do reservatório do flagelo no corpo celular (lateral ou terminal), os tripanosomatídeos podem ser divididos em dois grupos com possível significado evolutivo (Baker 1963, Wallace 1966), cada qual seguindo um padrão próprio de diferenciação celular. Esta diferenciação envolve modificações na forma e tamanho do corpo do parasita, no tamanho do flagelo e na posição do complexo cinetoplasto/corpo basal/bolsa flagelar em relação ao núcleo e às extremidades da célula (Wallace 1966, 1979, Vickerman

1976, 1990). Com isto são geradas diferentes formas evolutivas, as quais têm recebido nomes particulares (Hoare & Wallace 1966, Brack 1968, Janovy *et al.* 1974, Ranque *et al.* 1974, Wallace 1977a, Yoshida *et al.* 1978a, Sousa *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1997), alguns sendo aqui propostos. A descrição abaixo baseia-se na observação de tripanosomatídeos ao M. O. em preparações coradas pelo Giemsa, incluindo também interpretações de nossa experiência. Entre colchetes, citamos o nome pelo qual o estágio era referido antes da revisão de Hoare & Wallace (1966).

- **Amastigotas:** formas ovais ou arredondadas, sem flagelo livre visível ao M. O. (Figs 1 a, 3 a). Dependendo do gênero a que pertencem, a emergência do flagelo inicia-se pela porção lateral ou terminal do corpo (Figs 1 b; 3 b). Os nomes micromastigota (Jadin 1971, *apud* Wallace 1977a) e esferomastigota (Meyer & De Souza 1976) foram propostos em substituição ao termo amastigota, mas não entraram em uso geral. (**nome antigo:** "leishmania")
- **Promastigotas:** formas alongadas, cujo flagelo emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não uma porção livre; o cinetoplasto é anterior ao núcleo (Fig. 1 c, d). (**nome antigo:** "leptomonas")
- **Paramastigotas:** formas alongadas, cujo flagelo emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não uma porção livre; o cinetoplasto fica ao lado do núcleo (Fig. 1 e).
- **Opistomastigotas:** formas alongadas, cujo flagelo emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não uma porção livre; o cinetoplasto é posterior ao núcleo (Fig. 1 f, m, n). (**nomes antigos:** "leptotripanosoma", "tripanoide", "tripaniforme", "tripanomórfico", "herpetotripaniforme", "tripanosoma")
- **Endomastigotas:** formas alongadas com flagelo curvado intracelularmente, o qual emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não uma porção livre (Fig. 1 g-l). Para efeito didático, chamamos de endomastigotas tipo 1 aquelas em que o flagelo intracelular não contorna o núcleo (Fig. 1 g, h, j-l) e de tipo 2 aquelas em que ele o contorna, conforme visto ao M.O. (Fig. 1 i). Yoshida *et al.* (1978a) denominou de endomastigotas apenas as formas sem flagelo livre, mas aqui também incluímos as flageladas. Wenyon (1913) viu formas semelhantes, considerando-as fases encistadas.
- **Coanomastigotas:** formas relativamente curtas e largas, com extremidade anterior em geral truncada (aspecto de grão de cevada); o flagelo emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não uma porção livre (Fig. 2 a-i). Em virtude da ocorrência de migração do cinetoplasto nas coanomastigotas, temos denominado as fases com cinetoplasto posnuclear (Fig. 2 d, e) de **metacoanomastigotas** (Sousa *et al.* 1996) em vez de **opistomorfos**, conforme sugerido por Teixeira *et al.* (1996, 1997). Propomos os nomes **procoanomastigotas** e

paracoanomastigotas, respectivamente, para os estágios com cinetoplasto anterior (Fig. 2 a, b) ou lateral (Fig. 2 c) em relação ao núcleo. Sugerimos designar **endocoanomastigotas** aquelas formas cujo flagelo é curvado intracelularmente (Fig. 2 g–i), considerando-as como tipo 1 quando o flagelo não contorna o núcleo (Fig. 2 g, h) e tipo 2 quando o flagelo o contorna (Fig. 2 i) conforme visto ao M.O.

- **Epimastigotas**: formas alongadas com cinetoplasto junto ou anterior ao núcleo e cujo flagelo emerge lateralmente, mantendo-se aderido à membrana celular (formando a chamada "membrana ondulante"), possuindo ou não uma porção livre (Fig. 3 c, d). (**nome antigo**: "critídia")
- **Tripomastigotas**: formas alongadas com cinetoplasto posterior ao núcleo e cujo flagelo emerge lateralmente, mantendo-se aderido à membrana celular (formando a chamada "membrana ondulante"), possuindo ou não uma porção livre (Fig. 3 e, f, i). O termo metatripanosoma proposto por Grassé (1952) foi considerado por Wallace (1977a) útil para definir os tripomastigotas totalmente diferenciados no vetor (metacíclicos); o termo metatripomastigota tem também sido utilizado com o mesmo significado. (**nome antigo**: "tripanosoma")
- **Esferomastigotas**: formas arredondadas cujo flagelo, após emergir à superfície do corpo, conserva-se total ou parcialmente aderido a ela, podendo apresentar ou não uma porção livre (Fig. 3 g, h). Este nome foi proposto por Brack (1968) para formas com estas características encontradas em *T. cruzi* quando no vetor. Entretanto, elas já haviam sido descritas em tecidos de hospedeiros vertebrado e invertebrado do *T. cruzi* (Mayer & Rocha Lima 1914, Elkeles 1944). (**nome antigo**: "leishmanias de 2ª ordem", proposto por Elkeles)
- **Escleromastigotas**: formas "císticas" ou de resistência encontradas em tripanosomatídeos monoxênicos (Ranque *et al.* 1974). Propomos o resgate deste nome para os chamados "cistos" de espécies de *Leptomonas* ou *Blastocrithidia*. Estes "cistos", quando totalmente diferenciados, não possuem flagelo livre e apresentam características ultraestruturais muito distintas das amastigotas (Reduth & Schaub 1988, Takata *et al.* 1996, Romeiro *et al.* 2000).

Ressaltamos que os nomes propostos para estágios evolutivos não são sujeitos a qualquer código, além de regras de uso gramatical. A decisão final sobre seu uso caberá aos pesquisadores, caso concordem que eles expressam melhor as características morfológicas dos estágios em questão (Wallace 1977a).

1.4. Gêneros da família Trypanosomatidae

A identificação dos estágios evolutivos, associada ao fato do tripanosomatídeo ser monoxênico ou heteroxênico, constituem a base para a identificação clássica dos gêneros da família. Nem todos os gêneros abaixo relacionados têm sido amplamente aceitos e aqui estão definidos por seus caracteres morfológicos e biológicos (Wallace 1966, 1979, Hoare 1972, Vickerman 1976, 1990, 1994, Lainson & Shaw 1979, 1987, 1992, McGhee & Cosgrove 1980, Podlipaev *et al.* 1990, Sousa & Côrte-Real 1991, Shaw 1992, Wallace *et al.* 1992, Podlipaev & Rokitskaya 1999). O protozoário encontrado em das fezes de cabras e denominado *Proleptomonas faecicola* Woodcock, 1914 não é um tripanosomatídeo, segundo Le Ray & Vickerman (1977).

1.4.1. Gêneros monoxênicos

- *Leptomonas* Kent, 1880. Parasitas de invertebrados (nematódeos, moluscos, rotíferos, insetos) e de protozoários ciliados. Embora não haja precisão sobre a diagnose deste gênero, tem sido formalmente aceito, que seus membros possuem apenas a forma promastigota e que algumas espécies apresentam "cistos" flagelares (Wallace 1966). A espécie-tipo, *Leptomonas bütschlii* Kent, 1880 foi descrita em um nematódeo marinho (*Trilobus gracilis*) (*apud* Wallace 1979), mas não foi reestudada, o que dificulta uma precisa definição tipológica do gênero. Segundo Nicoli *et al.* (1971a) e Podlipaev 2000, *L. bütschlii* não pode ser confiavelmente aceita, pois não tem características de um tripanosomatídeo. Nicoli *et al.* (1971a, b) propuseram os nomes genéricos *Nematodomonas* e *Malacozomonas*, respectivamente, para os tripanosomatídeos de nematódeos e moluscos. O primeiro parasita de inseto descrito neste gênero foi *L. jaculum* Léger, 1902 (Léger 1902a, b). Hoje sabe-se que sob a denominação genérica de *Leptomonas* existe de fato uma mistura de táxons (Kolesnikov *et al.* 1990, Camargo *et al.* 1992, Podlipaev 2000), sendo que isto pode ser facilmente constatado pela análise dos caracteres morfológicos e biológicos das espécies disponíveis identificadas neste gênero (Sousa *et al.* 1998d, e; ver Anexos 7.3.8, 7.3.12).
- *Herpetomonas* Kent, 1880. Parasitas de insetos. Possuem, além de promastigotas, para- e opistomastigotas e, embora estas últimas geralmente ocorram em baixos percentuais, passaram a ser consideradas de valor diagnóstico por Wallace (1966), seguindo a opinião de diversos autores (*e.g.* Wenyon 1913). Parasitas do trato intestinal. As formas biflageladas, interpretadas como um processo de divisão estagnado, inicialmente foram consideradas de valor diagnóstico (Prowazek 1904). Espécie-tipo: *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880. Alguns autores consideram a possibilidade de certas *Herpetomonas* spp. serem heteroxênicas ou mesmo parasitas oportunistas (McGhee & Cosgrove 1980, Conchon *et al.*

1989, Sousa *et al.* 1997d, 1998b, Cavazzana Jr *et al.* 1998; ver Anexos 7.3.6 e 7.3.9).

- ***Crithidia*** Léger, 1902. Tripanosomatídeos relativamente pequenos e mais largos que aqueles dos demais gêneros. Formalmente possuem a forma coanomastigota; com cinetoplasto ante- ou paranuclear. Parasitas do intestino de insetos, em particular da ampola retal, onde freqüentemente ocorrem agrupados ou formando um "tapete" na parede intestinal. Espécie-tipo: *Crithidia fasciculata* Léger, 1902. Ver Anexo 7.4.1. Hoje, sabe-se que sob a denominação genérica *Crithidia* ocorre uma mistura de táxons (Sousa & Côte-Real 1991, Clark 1997, Fernandes *et al.* 1997, Hollar *et al.* 1998, Brandão *et al.* 2000). O isolamento de uma *Crithidia* a partir de um vegetal foi descrito por Almeida (1993).
- ***Blastocrithidia*** Laird, 1959. Parasitas de artrópodes. Formalmente apenas com o estágio de epimastigota; algumas espécies possuem "cistos flagelares". Espécie-tipo: *Blastocrithidia gerridis* (Patton, 1908) Laird, 1959. Duas amostras isoladas de insetos hematófagos (culicídeos, fêmeas) estão classificadas neste gênero (*B. pessoai* e *B. culicis*); entretanto, ambas podem apresentar tripomastigotas (Ayroza-Galvão & Coutinho 1941, Sousa 1994b). Estas amostras, juntamente com aquelas isoladas de tabanídeos, deveriam merecer novas pesquisas para verificar se pertencem ao gênero *Trypanosoma* (Wallace 1966, Sousa 1994b).
- ***Rhynchoidomonas*** (Patton, 1910) Patton, 1910. Parasitas de dípteros não sugadores (intestino e principalmente túbulos de Malpighi). Possuem exclusivamente o estágio de tripomastigota, este sendo alongado e afilado em ambas extremidades, principalmente na posterior; sem "membrana ondulante" ou flagelo livre. Espécie-tipo: *Rhynchoidomonas luciliae* (Patton, 1910) Patton, 1910. Wallace (1979) acreditou na possibilidade da existência destes organismos porque foram descritos separadamente por diversos autores em diferentes países. Vickerman (1976) enfatizou que este grupo precisa ser reinvestigado.
- ***Wallaceina*** (Podlipaev *et al.*, 1990) Podlipaev & Rokitskaya, 1999. Inicialmente denominado *Proteomonas*. Parasitas de insetos (Hemiptera: Miridae e Nabidae). Formalmente caracterizados pela presença de promastigotas, endomastigotas e opistomastigotas, estas últimas sendo consideradas fases de transição para endomastigotas. Espécie-tipo: *Wallaceina inconstans* (Podlipaev *et al.*, 1990) Podlipaev & Rokitskaya, 1999. Na realidade, a forma do corpo neste gênero é predominantemente coanomastigota; assim sendo, seus estágios seriam mais precisamente identificados como pro-, meta- e endocoanomastigotas.
- ***Angomonas*** Sousa & Côte-Real, 1991. Tipicamente coanomastigota quanto à forma do corpo, mas o cinetoplasto pode migrar para a posição posnuclear (metacoanomastigotas). Neste gênero podem ocorrer elevadas taxas de crescimento e diferenciação celular *in vitro*

(Sousa 1991). Embora ainda não sendo amplamente aceito, diversos estudos moleculares evidenciam a pertinência deste gênero (Camargo *et al.* 1992, Clark 1997, Brandão *et al.* 2000). Espécie-tipo: *Angomonas deanei* (Carvalho, 1973) Sousa & Côrte-Real, 1991. Ver anexo 7.2.

1.4.2. Gêneros heteroxênicos

- *Leishmania* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903. Parasitas de mamíferos (entre eles seres humanos) e de insetos (flebotomíneos), estes últimos atuando como vetores. Nos mamíferos apresentam-se como amastigotas intracelulares (sistema macrofágico celular) e nos insetos como promastigotas. O gênero tem sido dividido nos subgêneros *Leishmania* Saf'janova, 1982 (antiga Seção Suprpylaria; Lainson & Shaw 1979), tendo como espécie-tipo *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903, e *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 (antiga Seção Peripyalaria; Lainson & Shaw 1979), tendo como espécie-tipo *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 *emend.* Matta, 1916.
- *Sauroleishmania* Ranque, 1973. Formalmente parasitas de répteis (sangue ou trato intestinal) e de flebotomíneos (intestino). No vertebrado, apresentam-se como promastigotas ou amastigotas; estas últimas podem ser encontradas em macrófagos ou células precursoras, eritrócitos e trombócitos (Killick-Kendrick *et al.* 1986, Telford 1995). No intestino de répteis ou flebotomíneos ocorrem como promastigotas. Espécie-tipo: *Sauroleishmania tarentolae* (Wenyon, 1920) Ranque, 1973. Wallbanks *et al.* (1985) considerou que a *S. tarentolae* seria parte do ciclo do *Trypanosoma platydactyli*; entretanto Pozio *et al.* (1986) comprovaram que estas espécies são distintas. Saf'janova (1982) (*apud* Killick-Kendrick *et al.* 1986) e Noyes *et al.* (1998) consideram *Sauroleishmania* um subgênero de *Leishmania*, mas estes últimos autores excluem os parasitas do intestino de répteis do subgênero. É oportuno assinalar que alguns destes organismos têm sido classificados em gêneros que geralmente parasitam insetos, como *Leptomonas* ou *Herpetomonas* (Dollahon & Janovy 1971, Vickerman 1976, Killick-Kendrick *et al.* 1986, Telford 1995).
- *Endotrypanum* Mesnil & Brimont, 1908. Parasitas intraeritrocitários de preguiças (gêneros *Choloepus* ou *Bradypus*) e de flebotomíneos. Formalmente descritos como possuindo estágios de epi- ou tripomastigotas no interior de eritrócitos do mamífero e promastigotas no invertebrado (ou em cultura axênica). Espécie-tipo: *Endotrypanum schaudinni* Mesnil & Brimont, 1908. Como nos diferentes gêneros de tripanosomatídeos o ponto de emergência do flagelo é lateral ou terminal (Figs 1–3), a combinação em um mesmo gênero dos estágios acima citados, em nosso entender, levanta duas questões expostas a seguir. As formas intraeritrocitárias foram realmente isoladas em cultura axênica? Estas formas são realmente epi- e tripomastigotas? Estudos morfológicos mais aprofundados e técnicas baseadas em

PCR podem auxiliar a esclarecer estes pontos.

- *Phytomonas* Donovan, 1909. Parasitas de plantas e insetos fitófagos, apresentando o estágio de promastigota e, às vezes, formas aflageladas, freqüentemente denominadas "amastigotas". Espécie-tipo: *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909. Está amplamente confirmado que em plantas também podem ocorrer tripanosomatídeos de outros gêneros, como *Herpetomonas*, *Crithidia* ou *Leptomonas* (Dollet & Wallace 1987, Conchon *et al.* 1989, Camargo *et al.* 1992, Almeida 1993, Campaner *et al.* 1995, Sousa *et al.* 1997d). Assinalamos que as características morfológicas das *Phytomonas* são conhecidas há muito tempo (*e.g.* Lafont 1910, França 1914, 1919, 1920, Stahel 1931, 1933, Harvey & Lee 1943; ver Anexos 7.4.5–7.4.7), mas seu valor diagnóstico não tem sido destacado em diversos trabalhos das últimas décadas. Sousa *et al.* (1997c, publicado com que os erros que não são dos autores; 1998c republicado na forma correta) compararam *Phytomonas* e *Herpetomonas* isoladas de plantas e verificaram que estes dois gêneros são facilmente distinguíveis por suas características morfológicas. Ver Anexo 7.3.11.
- *Trypanosoma* Gruby, 1843. Parasitas do sangue ou outros tecidos de vertebrados (entre eles seres humanos) e do intestino de artrópodes (principalmente insetos) e hirudíneos. No vertebrado podem ocorrer como tripomastigotas, epimastigotas ou amastigotas; no invertebrado apresentam os dois primeiros estágios. Podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado por via inoculativa (metacíclicos gerados nas porções anteriores do tubo digestivo ou glândulas salivares) ou contaminativa (metacíclicos gerados na ampola retal e eliminados pelas fezes). Por conta disto, Hoare (1972) reuniu os tripanosomas de mamíferos em duas Seções (Salivaria e Stercoraria), nelas incluindo diferentes subgêneros. Espécie-tipo: *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) Gruby, 1843. Assinalamos que não ocorrem promastigotas no gênero *Trypanosoma*, apesar de sua menção por Hoare (1972). Na realidade, certas formas com o cinetoplasto mais próximo da extremidade anterior do parasita podem ser confundidas com promastigotas, mas nelas o flagelo emerge lateralmente sendo, portanto, epimastigotas.

1.5. Histórico: primeiros relatos sobre tripanosomatídeos

De acordo com Hoare (1972), possivelmente quem primeiro viu estágios de um tripanosoma foi o próprio "Pai da Protozoologia", Anton van Leeuwenhoek (1680), ao encontrar no intestino de tabanídeos formas que podiam pertencer ao *Trypanosoma theileri*. Somente muitos anos após, Dobell (1832) relatou organismos semelhantes nestes mesmos insetos (*apud* Wallace 1966). Fases sanguícolas de um tripanosoma talvez tenham sido vistas pela primeira vez por Valentin (1841) em um peixe (*Salmo fario*); entretanto, Laveran & Mesnil

(1912) levantaram a hipótese de que o referido parasita fosse um tripanoplasma (*apud* Hoare 1972). Nos anos seguintes, Gluge (1842), Meyer (1843) e Gruby (1843) descreveram tripanosomas do sangue de rãs, mas foi o último autor quem propôs o gênero *Trypanosoma* e o nome *T. sanguinis* para o organismo encontrado. Entretanto, como Mayer havia descrito o parasita alguns meses antes de Gruby, denominando-o *Amoeba rotatoria*, a espécie-tipo passou a ser chamada de *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) Gruby, 1843 (*apud* Hoare 1964).

Os primeiros achados de parasitas dos gêneros *Leishmania* foram relatados detalhadamente por Gardener (1977), desde a primeira observação feita por Cunningham (1885) até a proposição do gênero *Leishmania* por Ross (1903) para corrigir a classificação equivocada de *L. donovani* no gênero *Piroplasma* feita por Laveran & Mesnil (1903).

Segundo Wenyon (1926), um tripanosomatídeo monoxênico foi visto pela primeira vez possivelmente por Burnett (1851, 1852) ao examinar o conteúdo intestinal de *Musca domestica*, identificando-o como *Bodo*. Posteriormente, Leidy (1856) teria encontrado um parasita semelhante em *M. domestica*, então denominando-o *Bodo muscarum*. Para este organismo, Kent (1880) criou o gênero *Herpetomonas* e o nome *H. muscae domesticae* (*apud* Wenyon 1926, Wallace 1966). Após revisão da nomenclatura feita por Hoare (1924), o parasita passou a ser chamado de *H. muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880.

Os tripanosomatídeos que parasitam plantas foram descobertos casualmente, quando Lafont (1909) pesquisava com auxílio de seu técnico (Sr David) o látex de plantas utilizadas na medicina popular. Lafont denominou o parasita de *Leptomonas davidi* em homenagem ao seu técnico, na realidade quem primeiro viu os organismos. No mesmo ano, Donovan (1909) propôs o gênero *Phytomonas* para os tripanosomatídeos encontrados em vegetais visando distinguí-los de formas semelhantes isoladas de vertebrados. Entretanto, durante muito tempo os nomes *Leptomonas*, *Herpetomonas*, ou mesmo *Trypanosoma* e *Leishmania*, foram utilizados para descrever tripanosomatídeos de vegetais (Lafont 1910, França 1914, 1919, 1920, 1921, Migone 1916, Franchini 1922, 1931, Fantham 1925, Wenyon 1926, Gibbs 1957, *apud* Dollet 1984). Após a descoberta de Lafont, houve grande interesse na pesquisa destes organismos devido à crença de que as plantas parasitadas pudessem ser reservatórios para certas leishmanioses ou tripanosomíases. Entretanto, após o trabalho de Holmes (1925) sobre a ausência de patogenicidade dos parasitas de plantas lactíferas, este interesse arrefeceu, apesar de outros importantes estudos terem sido publicados (*e.g.* França 1914, 1919, 1920, Migone 1916, Aragão 1927, Stahel 1931, 1933, Harvey & Lee 1943, Gibbs 1957). O interesse pelo grupo só ressurgiu após a incriminação das *Phytomonas* como agentes etiológicos de doenças fatais para coqueiros ("hartrot") e dendezeiros ("marchitez sorpressiva") (Parthasarathy *et al.* 1976, Dollet *et al.* 1977, *apud* Dollet 1984, *apud* Jankevicius *et al.* 1988).

1.6. O estudo dos tripanosomatídeos e sua taxonomia até a década de 60

Até os anos 60, os estudos sobre os tripanosomatídeos visavam principalmente conhecer sua morfologia, hospedeiros, ciclos de vida, vetores, modos de transmissão, infectividade e patogenicidade para animais de experimentação (ou mesmo *voluntários* humanos) e tentativas de cultivo *in vitro*. O primeiro meio de cultura foi obtido para *Trypanosoma lewisi* por Novy & MacNeal em 1903 (*apud* Taylor & Baker 1968), embora diversos estudos sobre a bioquímica e fisiologia destes organismos também tenham sido realizados (Zotta 1923, Noguchi 1926, Lwoff 1949, 1951, Hutner & Provasoli 1955, Guttman & Wallace 1964, *apud* Wallace 1966). Nesse período, vários gêneros foram criados, mas alguns não foram confirmados ou caíram em sinonímia. Também muitas espécies foram descritas e freqüentemente mudadas de posição taxonômica, tanto porque havia imprecisão na definição dos gêneros, quanto porque alguns ciclos de vida tornavam-se conhecidos.

A ocorrência de infecções mistas nos hospedeiros vertebrados ou invertebrados induziu diversos pesquisadores a interpretar fases evolutivas de diferentes organismos como etapas de apenas um. Um dos erros de interpretação mais conhecidos (o qual perdurou por mais de meio século) foi cometido por Patton (1908) ao redescrever o gênero *Crithidia* Léger, 1902, considerando as formas alongadas com membrana ondulante, hoje chamadas epimastigotas, como típicas do gênero; por outro lado, as formas em "grão de cevada" descritas na publicação original de Léger (coanomastigotas de hoje) foram consideradas fases jovens do gênero *Herpetomonas*. Apesar de Novy *et al.* (1907) terem demonstrado que na descrição de Léger (1902c) havia duas espécies, esse erro foi repetido por Woodcock (1914b), que na mesma ocasião transferiu a *C. fasciculata* para o gênero *Leptomonas*. Posteriormente, Wenyon (1926) em sua grandiosa "*Protozoology*" (1.563 pp.), também adotou a definição do gênero *Crithidia* no *sensu* Patton (1908), o que propiciou sua difusão e uso em diversos trabalhos e importantes livros textos (*e.g.* Grassé 1952, Kudo 1966, Manwell 1968).

Outra complicação na taxonomia dos tripanosomatídeos decorreu da imprecisão de Kent (1980) ao descrever os gêneros *Leptomonas* e *Herpetomonas* baseando-se em observações a fresco (*apud* França 1920). Posteriormente, Bütschli (1884) entendeu que estes gêneros não podiam ser distinguidos e que deveriam ser reunidos no gênero *Herpetomonas* (*apud* Wallace 1966). Outros autores seguiram as idéias de Bütschli quanto à fusão dos dois gêneros, mas optaram pela denominação *Leptomonas* com base na "Lei da Prioridade" do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, uma vez que este nome foi proposto em página anterior da mesma obra de Kent (*apud* Wallace 1966). O reestudo da espécie-tipo de *Herpetomonas muscarum* levou alguns autores a buscarem caracteres que distinguíssem as

Leptomonas das *Herpetomonas*. Alguns autores {Prowazek 1904, Chatton 1909, Dunkerly 1911 (*apud* Strickland 1911, *apud* França 1920), Roubaud 1911b, Woodcock 1914a} definiram as *Herpetomonas* como sendo tipicamente biflageladas e as *Leptomonas* monoflageladas, enquanto outros (Patton 1908, Wenyon 1913, 1926, Bellosillo 1937) interpretaram as formas biflageladas como fases de um processo de divisão. Wenyon (1913, 1926), inclusive, chamou atenção para a presença de formas com cinetoplasto posterior nas *Herpetomonas* (denominando-as "tripaniformes" ou mesmo "tripanosomas") como sendo o caráter distintivo do gênero. Estas formas já haviam sido vistas por Roubaud (1908, 1911b, c) e Chatton & Léger 1911 (*apud* Roubaud 1912), mas consideradas como parte do ciclo das *Leptomonas* que, por estes autores, também eram monoflageladas. Woodcock (1914b) também encontrou formas com cinetoplasto posterior nas *Herpetomonas*, denominando-as "herpetotripaniformes", mas não as considerou distintivas do gênero.

Noguchi & Tilden (1926) distinguiram os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, mas optaram por identificar como *Herpetomonas* todas as amostras que haviam isolado de insetos e plantas. Com isto, sem qualquer embasamento no Código de Nomenclatura Zoológica, denominaram de *Herpetomonas culicidarum* uma amostra de *Crithidia fasciculata* (ATCC 11745) e de *H. muscidarum* um isolado de *Musca domestica*, este considerado depois por Wallace (1966) como sinônimo de *H. muscarum*. Também denominaram de *H. oncopelti* dois isolados diferentes pelas suas próprias descrições, os quais hoje em dia são conhecidos como *Leptomonas oncopelti* (amostra cistogênica) e *Crithidia oncopelti* (ATCC 12982).

Lwoff & Lwoff (1931), visando distinguir as espécies então chamadas de *Leptomonas fasciculata* e *L. oncopelti* das *Leptomonas* de pulga (tipo *L. ctenocephali*), propuseram para as mesmas o subgênero *Strigomonas*. Este nome foi depois utilizado por Thomson & Robertson (1932) e Grassé (1952) com *status* de gênero. Entretanto, estes autores não diferenciaram as *Leptomonas* das *Phytomonas* ou *Herpetomonas*, embora Grassé (1952) apresentasse em suas ilustrações formas com cinetoplasto posnuclear ("tripanoides"). É interessante também assinalarmos que, no início do século, alguns autores {Patton, Alexeieff e outros (*apud* Wenyon 1913 e França 1920)} consideraram as espécies de *Leishmania* também como sendo *Leptomonas* ou *Herpetomonas*. Estes relatos apenas exemplificam a confusão que se estabeleceu na taxonomia dos tripanosomatídeos, cuja ordem só foi retomada a partir dos trabalhos de Wallace (1943, 1966, 1977a, 1979), Laird (1959), Hoare (1964, 1972), Hoare & Wallace (1966) e Vickerman (1976). Sem a leitura destes trabalhos, começando por aquele que propõe uma nova nomenclatura para os estágios evolutivos dos tripanosomatídeos (Hoare & Wallace 1966), além do conhecimento dos sinônimos publicados por diversos autores (Wallace 1966, Hoare 1972, Gardener 1977, Podlipaev 1990), fica muito difícil compreender a literatura

daquele período, além de identificar e classificar os tripanosomatídeos por uma abordagem parasitológica clássica.

1.7. Outras técnicas de estudo dos tripanosomatídeos

1.7.1. Análises ultraestruturais

Os tripanosomatídeos também têm sido analisados através de microscópios de alto poder de resolução (eletrônico de transmissão, varredura, etc). A partir da década de 60, com o aprimoramento das técnicas de fixação, emblocagem, contraste, além do aperfeiçoamento dos próprios equipamentos (*apud* Paulin 1992, De Souza 1999), diversos estudos evidenciaram importantes semelhanças ou diferenças entre espécies (ou mesmo estágios) de tripanosomatídeos, além de peculiaridades compartilhadas por alguns grupos (*e.g.* Mühlpfordt 1963, 1975, 1981, Simpson 1972, Vickerman & Preston 1976, Freymuller & Camargo 1981, Soares *et al.* 1987, Attias *et al.* 1988, Soares & De Souza 1988, Milder *et al.* 1990, De Souza & Attias 1991, Attias & De Souza 1992, Sanchez-Moreno *et al.* 1995a, De Souza 1999). Entretanto, marcadores ultraestruturais para identificação genérica de tripanosomatídeos ainda não foram definidos, embora um número maior de glicossomas tenha sido evidenciado no gênero *Phytomonas* (*apud* Camargo 1999).

1.7.2. Análises por técnicas sorológicas

Técnicas sorológicas para detectar diferenças antigênicas entre isolados/espécies de tripanosomatídeos têm sido há muito tempo empregadas, em geral para distinguir parasitas considerados morfológicamente semelhantes (*e.g.* Noguchi 1926, Hauschka *et al.* 1950, Adler 1963, McGhee & Hanson 1963, Lainson & Shaw 1966, Nussenzweig & Goble 1966, Vitetta & Gutman 1967, Gray 1970, Woo & Soltys 1972, Latif & Adam 1973, Ketteridge 1975, Dooris & McGhee 1976, Andrade *et al.* 1981, Costacurta *et al.* 1997). O advento da tecnologia dos hibridomas em 1976 (*apud* Alberts *et al.* 1989) possibilitou a produção de anticorpos monoclonais altamente específicos e seu uso tornou-se muito difundido, assim contribuindo para o aprimoramento do diagnóstico e da classificação dos tripanosomatídeos (*e.g.* Anthony *et al.* 1981, McMahon-Pratt *et al.* 1984, 1986, Segura & Cazzulo 1985, Petry *et al.* 1986, 1989, Hudson *et al.* 1987, Shaw *et al.* 1987, Conchon *et al.* 1989, Jankevicius *et al.* 1989, Sbravate *et al.* 1989, Teixeira & Camargo 1989, Acosta *et al.* 1991, Camargo *et al.* 1992, Attias *et al.* 1993, Campaner *et al.* 1995, Bosompem *et al.* 1996, Grimaldi Jr & McMahon-Pratt 1996, Teixeira *et al.*

1.7.3. Análises fenotípicas por técnicas bioquímicas

Empregadas desde as primeiras décadas do século XX (revisões de Newton 1968, 1976), as técnicas bioquímicas para estudo dos tripanosomatídeos aprimoraram-se e continuaram a ser muito utilizadas com fins taxonômicos, entre outros. Algumas destas análises foram facilitadas após o surgimento de diversos meios de cultura de composição química definida.

Dentre as mais utilizadas, citamos: • **determinação dos requerimentos nutricionais** (e.g. Mundin *et al.* 1974, Mundin & Roitman 1977, Steiger & Steiger 1977, Hutner *et al.* 1979, Manaia *et al.* 1981, Alfieri & Camargo 1982, Fiorini *et al.* 1989, 1996, Tavares-da -Silva & Roitman 1990, Menezes & Roitman 1991, Almeida 1993, Faria-e-Silva *et al.* 1994, Reuter-Filho *et al.* 1997), • **identificação de vias metabólicas, substratos utilizados e produtos catabólicos** (e.g. Gutteridge 1976, Yoshida & Camargo 1978, Ceron *et al.* 1979, Cazzulo *et al.* 1985, Vickerman 1985, 1994, Sanchez-Moreno *et al.* 1992, 1995b, Almeida 1993, Fernández-Becerra *et al.* 1997, Redman & Coombs 1997, Tielens & Hellemond 1998), • **detecção de enzimas, entre elas, catalases, proteases, enzimas do metabolismo da ornitina-arginina, sialidases/transsialidades** (e.g. Wertlieb & Guttman 1963, Camargo *et al.* 1978a, b, 1987, Figueredo *et al.* 1978, Galinari & Camargo 1978, 1979, Yoshida *et al.* 1978b, Camargo 1979, Camargo *et al.* 1982, 1992, Conchon *et al.* 1989, Jankevicius *et al.* 1989, Sbravate *et al.* 1989, Etges 1992, Itow-Jankevicius *et al.* 1993, Branquinha *et al.* 1994b, 1996, Medina-Acosta *et al.* 1994, Ono *et al.* 1994, Vickerman 1994, Campaner *et al.* 1995, Batistoti *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1996, 1997, Dutra *et al.* 1997, Uttaro & Opperdoes 1997, Franco & Grimaldi Jr 1999), • **verificação da composição química celular, inclusive de superfície** (e.g. Taylor & Williams 1977, Ebert *et al.* 1978, Fish *et al.* 1981, Previato *et al.* 1982, Taylor *et al.* 1982, 1983, McLaughlin *et al.* 1983, Cazzulo *et al.* 1985, Basso *et al.* 1986, Gomez-Eichelmann *et al.* 1988, Abreu-Filho *et al.* 1994, Branquinha *et al.* 1994a, 1995, Faria-e-Silva *et al.* 1994), • **identificação de resíduos de carboidratos de membrana utilizando lectinas como sondas** (e.g. Bretting & Schottelius 1978, Gueugnot *et al.* 1980, Schottelius 1982, Schottelius *et al.* 1983, 1986, Miranda-Santos & Pereira 1984, Schaub & Schottelius 1984, Schottelius & Muller 1984, Ghosh *et al.* 1987, 1990, Petry *et al.* 1987, Zimmermann *et al.* 1987, Acosta *et al.* 1991, Gazzinelli *et al.* 1991, Nakamura *et al.* 1992, 1994, Faria-e-Silva *et al.* 1994, Sanchez-Moreno *et al.* 1995a), • **identificação eletroforética de múltiplas formas enzimáticas (isoenzimas, em particular as aloenzimas)**, a seguir.

Gardener & Howels (1972), Bagster & Parr (1973), Ebert (1973), Kilgour & Godfrey (1973), Parr & Bagster (1974) e Toyé (1974) foram pioneiros no emprego da análise das isoenzimas no estudo dos tripanosomatídeos e esta técnica continua sendo uma das mais empregadas para caracterização e identificação dos tripanosomatídeos, inferências

taxonômicas e filogenéticas, ou mesmo em estudos epidemiológicos (e.g. Dooris & McGhee 1976, Godfrey & Kilgour 1976, Gutteridge 1976, Miles *et al.* 1977, 1978, 1980, 1984, Gibson *et al.* 1978, 1980, Gonçalves de Lima *et al.* 1979, 1982, Ready & Miles 1980, Sá *et al.* 1980, Lanham *et al.* 1981, Lanotte *et al.* 1981, 1986, Tibayrenc *et al.* 1981, Camargo *et al.* 1982, Deane *et al.* 1984, Tibayrenc & Le Ray 1984, Rioux *et al.* 1985, 1990, Ebert 1986, Le Blancq *et al.* 1986, Kreutzer *et al.* 1987, Vainstein *et al.* 1987, Travi *et al.* 1989, Acosta *et al.* 1991, Faria-e-Silva *et al.* 1991, Grimaldi Jr *et al.* 1991, Motta *et al.* 1991, Guerrini *et al.* 1992, Lun *et al.* 1992a, Martin *et al.* 1992, Mebrahtu *et al.* 1992, Stevens & Godfrey 1992, Böse *et al.* 1993, Dirie *et al.* 1993b, Sibajev *et al.* 1993, Cupolillo *et al.* 1994, Mathieu-Daudé & Tibayrenc 1994, Muller *et al.* 1994, 1997, Pacheco *et al.* 1994, Franco *et al.* 1996, Podlipaev & Rokitskaya 1999, Romeiro *et al.* 2000).

1.7.4. Análises genotípicas

Os estudos dos tripanosomatídeos por análise de DNA foram iniciados nos anos 60. Estes trabalhos empregaram diferentes técnicas para a determinação da quantidade total ou relativa do nDNA ou kDNA, análise de sua composição por ultracentrifugação em gradiente de densidade em cloreto ou sulfato de céσιο (ou outro método), esta acompanhada ou não de estimativas dos percentuais de G+C e A+T (e.g. Baker 1961, Schildkraut *et al.* 1962, Du Buy *et al.* 1963, Riou & Paolete 1967, Riou & Delain 1969, Riou & Pautrizel 1969, Chance 1972, Renger & Wolstenholme 1972, Simpson 1972, Chance *et al.* 1973, 1974, López & Melton Jr 1975, Newton 1976, Riou & Gutteridge 1978, Riou & Saucier 1979, Barker & Arnot 1981, Borst *et al.* 1982, Dvorak *et al.* 1982, Riou *et al.* 1987, Kooy *et al.* 1989, Mühlpfordt & Berger 1990, Pestov *et al.* 1990, Dias-Neto *et al.* 1991, Podlipaev *et al.* 1991, Garside *et al.* 1994).

Com a descoberta da possibilidade de formação de moléculas híbridas de DNA por renaturação com seqüências complementares (Schildkraut *et al.* 1961), experimentos de hibridização também passaram a ser empregados para evidencição de afinidades entre espécies de tripanosomatídeos, inicialmente utilizando-se como sonda RNA complementar marcado com trítio (revisão de Newton 1976). Posteriormente, diversos procedimentos de hibridização (*dot blotting*, *slot dot blotting*, *in situ*, etc) passaram também a empregar, como sondas ou alvo, DNA total, seqüências do rDNA, kDNA, ou mesmo do RNA (e.g. Morel *et al.* 1984, Barker *et al.* 1986, Simpson 1987, Ashal & Miles 1988, Greig *et al.* 1989, Dirie *et al.* 1993b, Sibajev *et al.* 1993, Pacheco *et al.*, 1994, 1996, Pires *et al.* 1995, Teixeira *et al.* 1996, 1997).

Após a descoberta e obtenção das endonucleases de restrição em estado purificado, além da verificação de sua utilidade na análise e reconstrução de moléculas de DNA (Smith & Wilcox 1970, Nathans & Smith 1975, Smith 1979, Alberts *et al.* 1989), os estudos genômicos dos tripanosomatídeos passaram por um considerável avanço. Estas enzimas também

propiciaram o desenvolvimento de técnicas de clonagem e propagação de seqüências de DNA *in vivo* com muitas aplicações na medicina (Engleberg & Eisenstein 1984) e biotecnologia em geral, entre elas, a produção de sondas para hibridizações moleculares.

As endonucleases de restrição clivam o DNA numa posição constante dentro de uma seqüência de reconhecimento que lhe é específica (tipicamente com 4-6 pares de bases), gerando fragmentos que podem diferir em tamanho (RFLPs) na dependência da seqüência de bases do DNA da amostra analisada. Tais fragmentos, submetidos à eletroforese e à "coloração" com brometo de etídio (ou outro marcador), revelam os perfis de restrição (*restriction fingerprints*) característicos dos organismos em estudo. Nos tripanosomatídeos, as enzimas de restrição têm sido utilizadas para análise do kDNA (minicírculos e/ou maxicírculos), nDNA ou rDNA, associada ou não a experimentos de hibridização molecular (*e.g.* Riou & Yot 1975, Mattei *et al.* 1977, Riou & Gutteridge 1978, Riou & Saucier 1979, Borst *et al.* 1980a, b, 1981, 1985, 1987, Leon *et al.* 1980, Morel *et al.* 1980, 1984, 1986, Sá *et al.* 1980, Arnot & Barker 1981, Frasch *et al.* 1981, Camargo *et al.* 1982, Barker & Butcher 1983, Deane *et al.* 1984, Massamba & Williams 1984, Spithill & Grumont 1984, Barker *et al.* 1986, Berverley *et al.* 1986, 1987, Riou *et al.* 1987, Rogers & Wirth 1987, Simpson 1987, Jankevicius *et al.* 1989, Ahomadegbe *et al.* 1990, 1992, Dietrich *et al.* 1990, Kolesnikov *et al.* 1990, Pestov *et al.* 1990, Gonçalves *et al.* 1991, Ou *et al.* 1991, Takeuchi & Traub-Cseko 1991, Macedo *et al.* 1992a, b, 1993, Vallejo *et al.* 1993, Sibajev *et al.* 1993, Muller *et al.* 1994, 1995, Pacheco *et al.* 1994, 1995, Campaner *et al.* 1995, 1996, Jirku *et al.* 1995, Pires *et al.* 1995, 1997, Franco & Grimaldi Jr 1999). Inclusive, Camargo *et al.* (1992, 1995), Camargo (1995) e Teixeira *et al.* (1997) verificaram que a presença e/ou ausência de sítios de clivagem para *Pvu* II e *Hind* III em determinadas seqüências do rDNA (SSU ou α LSU) podem discriminar grupos de espécies ou gêneros dos chamados "tripanosomatídeos inferiores" (*Crithidia*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*).

Nos últimos anos da década de 70 até início da década de 90, o substancial incremento na análise genômica dos tripanosomatídeos decorreu dos seguintes fatos: • **aprimoramento dos métodos de seqüenciamento de DNA** (Maxam & Gilbert 1977, Sanger *et al.* 1977), • **advento da eletroforese de campo pulsado**, possibilitando a análise de cromossomas íntegros (Schwartz & Cantor 1984, Carle & Olson 1984, Chu *et al.* 1986), • **aprimoramento de técnicas de amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR)** (Saiki *et al.* 1985, 1988), • **idealização da PCR utilizando iniciadores aleatórios ou universais (RAPD, AP-PCR, UP-PCR)** (Welsh & McClelland 1990, Williams *et al.* 1990, Bulat *et al.* 1992).

Estas técnicas, geralmente empregadas em combinação com outras acima referidas, geraram uma extensa gama de publicações que possibilitaram grandes avanços na

identificação, caracterização e agrupamento de espécies com finalidades diversas (e.g. Borst *et al.* 1980 b, 1981, Van der Ploeg *et al.* 1984, Giannini *et al.* 1986, Macina *et al.* 1986, Aymerich & Goldenberg 1987, Gomez-Eichelmann *et al.* 1988, Moser *et al.* 1989, Sturm *et al.* 1989, 1995, Avila *et al.* 1990, Pestov *et al.* 1990, Marakhova *et al.* 1991, Uliana *et al.* 1991, Bastien *et al.* 1992, Breniere *et al.* 1992, 1995, Briones *et al.* 1992, Clark 1992, 1997, Guevara *et al.* 1992, Lun *et al.* 1992b, Murthy *et al.* 1992, Tavares *et al.* 1992, Amorin *et al.* 1993, Bhattacharyya *et al.* 1993, Böse *et al.* 1993, Britto *et al.* 1993, Dirie *et al.* 1993a, b, Fernandes *et al.* 1993, 1994, 1997, Hassan *et al.* 1993, Souto & Zingales 1993, Steindel *et al.* 1993, 1994, Tibayrenc *et al.* 1993, Waitumbi & Murphy 1993, Bèjà *et al.* 1994, Clark & Pung 1994, Degrave *et al.* 1994, Garside *et al.* 1994, Gibson 1994, Gonzales *et al.* 1994, Nunes *et al.* 1994, 1995, Sousa *et al.* 1994b, 1996, Teixeira *et al.* 1994, Vallejo *et al.* 1994, Baron *et al.* 1995, Campaner *et al.* 1995, 1996, Cano *et al.* 1995, Clark *et al.* 1995, Cupolillo *et al.* 1995, Marché *et al.* 1995, Henriksson *et al.* 1996a, b, Lun & Desser 1996, Maslov *et al.* 1996, Motazedian *et al.* 1996, Muller *et al.* 1997, Cavazzana Jr *et al.* 1998, Hollar *et al.* 1998, Stothard *et al.* 1998, 2000, Tibayrenc 1998, Zingales *et al.* 1998, Bulat *et al.* 1999, Figueroa *et al.* 1999, Franco & Grimaldi Jr 1999, Serrano *et al.* 1999a, b, c, Stevens *et al.* 1999, Wright *et al.* 1999, Fiorini *et al.* 2000, Podlipaev & Frolov 2000, Toaldo *et al.* 2000).

Entre outras técnicas de análise genômica empregadas para caracterização e comparação de tripanosomatídeos, citamos a análise de estrutura e estimativas do tamanho dos rRNAs e dos maxicírculos e/ou minicírculos do kDNA (e.g. Riou & Gutteridge 1978, Riou & Saucier 1979, Leon *et al.* 1980, Barker & Arnot 1981, Spithill & Grumont 1984, Borst *et al.* 1985, Villalba *et al.* 1985, Peres 1987, Riou *et al.* 1987, Simpson 1987, Peres & Guimarães 1989, Ahomadegbe *et al.* 1990, 1992, Pestov *et al.* 1990, Stuart & Feagin 1992, Recinos *et al.* 1994, Jirku *et al.* 1995, Muller *et al.* 1995, Hollar *et al.* 1998, Brandão *et al.* 2000). Diversos resultados obtidos por estas abordagens têm sido úteis para inferências taxonômicas na família Trypanosomatidae.

1.7.5. Análises computacionais de dados bioquímicos ou moleculares

Visando agrupamentos de espécies com finalidades taxonômicas, filogenéticas ou mesmo epidemiológicas, em vários dos trabalhos de caracterização bioquímica e/ou molecular acima citados, os dados foram codificados para processamento computacional utilizando índices e algoritmos diversos para análises fenética, cladística, filética ou mesmo de genética de populações (e.g. Sneath & Sokal 1962, 1973, Michener 1970, Lewontin 1974, Tibayrenc 1980, Mickevick & Mitter 1981, Wiley 1981, Buth 1984, Hillis & Moritz 1990, Rioux *et al.* 1990, Mayr & Ashlock 1991, Avise 1994).

1.8. Justificativas para o presente trabalho

Conforme revimos, nas últimas três décadas deste século, os tripanosomatídeos foram intensa e predominantemente estudados por abordagens bioquímicas e/ou moleculares. Neste mesmo período, houve também um acentuado decréscimo no estudo destes organismos através de procedimentos clássicos em Protozoologia, como as análises morfológicas, biológicas e biométricas. Diversos autores têm, inclusive, mencionado que o estudo dos tripanosomatídeos por seus caracteres morfológicos ao M.O. é de pouca ou nenhuma utilidade, insuficiente, impraticável, etc, para distinguir vários gêneros e/ou espécies (e.g. Dollet 1984, Sbravate *et al.* 1989, Teixeira & Camargo 1989, Vickerman 1990, Acosta *et al.* 1991, Camargo *et al.* 1992, Wallace *et al.* 1992, Medina-Acosta *et al.* 1994, Marché *et al.* 1995, Dollet *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1996, Bulat *et al.* 1999, Camargo 1999, Figueroa *et al.* 1999, Grisard *et al.* 1999, Serrano *et al.* 1999a, b, c, Stevens *et al.* 1999, Podlipaev 2000). Os principais argumentos contra o uso desta última abordagem basearam-se na grande variabilidade de tamanho e forma (ou estágio) de alguns gêneros e/ou espécies, além das modificações apresentadas por tripanosomatídeos em resposta ao hospedeiro, meios ou condições de cultivo (e.g. Sbravate *et al.* 1989, Acosta *et al.* 1991, Dollet 1994, Camargo 1999, Grisard *et al.* 1999, Serrano *et al.* 1999a). Estes fatos já são conhecidos há muito tempo (Noguchi & Tilden 1926) e foram confirmados por diversos autores (e.g. McGhee & Hanson 1971, McGhee & Postell 1976, Roitman *et al.* 1976, 1977, Yoshida *et al.* 1978a, Dollet *et al.* 1982, Kastelein & Parsadi 1984, Segeren & Jong 1985, Jankevicius *et al.* 1989, Manaia *et al.* 1991, Romeiro *et al.* 1994, Camargo 1999), inclusive pela autora do presente trabalho (Sousa 1991). Achamos oportuno enfatizar que são esperadas variações em expressões fenotípicas (como forma e tamanho) em decorrência do meio de cultivo do organismo, inclusive em análises bioquímicas (Newton 1976). Assim sendo, estudos fenotípicos exigem condições experimentais padronizadas.

Uma das mais importantes contribuições das análises sorológicas, bioquímicas e moleculares acima citadas foi confirmar ou questionar a classificação de diversos tripanosomatídeos conforme estabelecida por abordagens clássicas. Assim, elaboramos o presente trabalho para reavaliar a importância das análises morfológicas, biológicas e biométricas para identificação e classificação de tripanosomatídeos, estudando amostras que, em sua maioria, haviam sido caracterizadas por pelo menos duas das técnicas mencionadas nos itens 1.7.2–1.7.5. Também procuramos contornar o problema da variabilidade destes organismos em função do meio, padronizando, tanto quanto possível, suas condições de cultivo *in vitro*, além do período e intervalos de tempo de estudo.

As amostras escolhidas para o presente trabalho foram isoladas de insetos ou plantas, estando classificadas nos gêneros *Crithidia*, *Angomonas*, *Wallaceina* (= *Proteomonas*), *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Phytomonas*. Todas compartilham o fato de seu reservatório flagelar abrir-se na região anterior do corpo. Por experiência prévia, não tão amplamente sistematizada, mas já com algumas publicações sobre o tema, entendemos que o conhecimento das características morfológicas e biológicas dos tripanosomatídeos pode ser de grande utilidade para sua taxonomia e/ou filogenia. Assim, pareceu-nos oportuno, como também premente, tentar resgatar tal conhecimento, inclusive porque sua aquisição baseia-se em métodos e técnicas simples, que utilizam reagentes e equipamentos de baixo custo. Além do mais, acreditamos que o treinamento de profissionais para realizar este trabalho não é mais complexo do que aquele necessário à execução de análises bioquímicas, moleculares ou sorológicas.

1.9. Objetivos deste trabalho

- Utilizando-se procedimentos parasitológicos clássicos baseados em microscopia óptica de campo claro, analisar comparativamente por diversas abordagens, em períodos e intervalos de tempo constantes, diversas amostras de tripanosomatídeos isoladas de insetos ou plantas, estas, durante o trabalho, sendo mantidas *in vitro* sob condições experimentais padronizadas em todos os aspectos possíveis.
- A partir desta análise, evidenciar caracteres que possam ser de valor diagnóstico para a identificação/classificação de tripanosomatídeos de insetos e plantas.
- Propor agrupamentos das amostras utilizadas no presente trabalho, associando estes grupos, se possível, aos gêneros já propostos.
- Rever a diagnose dos gêneros atualmente considerados (amplamente aceitos ou não).
- Identificar questões taxonômicas e problemas de nomenclatura referentes às amostras estudadas.
- Pesquisar nas amostras em estudo a ocorrência de eventos citológicos sugestivos de etapas de fenômenos de sexualidade, como também apurar sua frequência nos diferentes grupos taxonômicos.

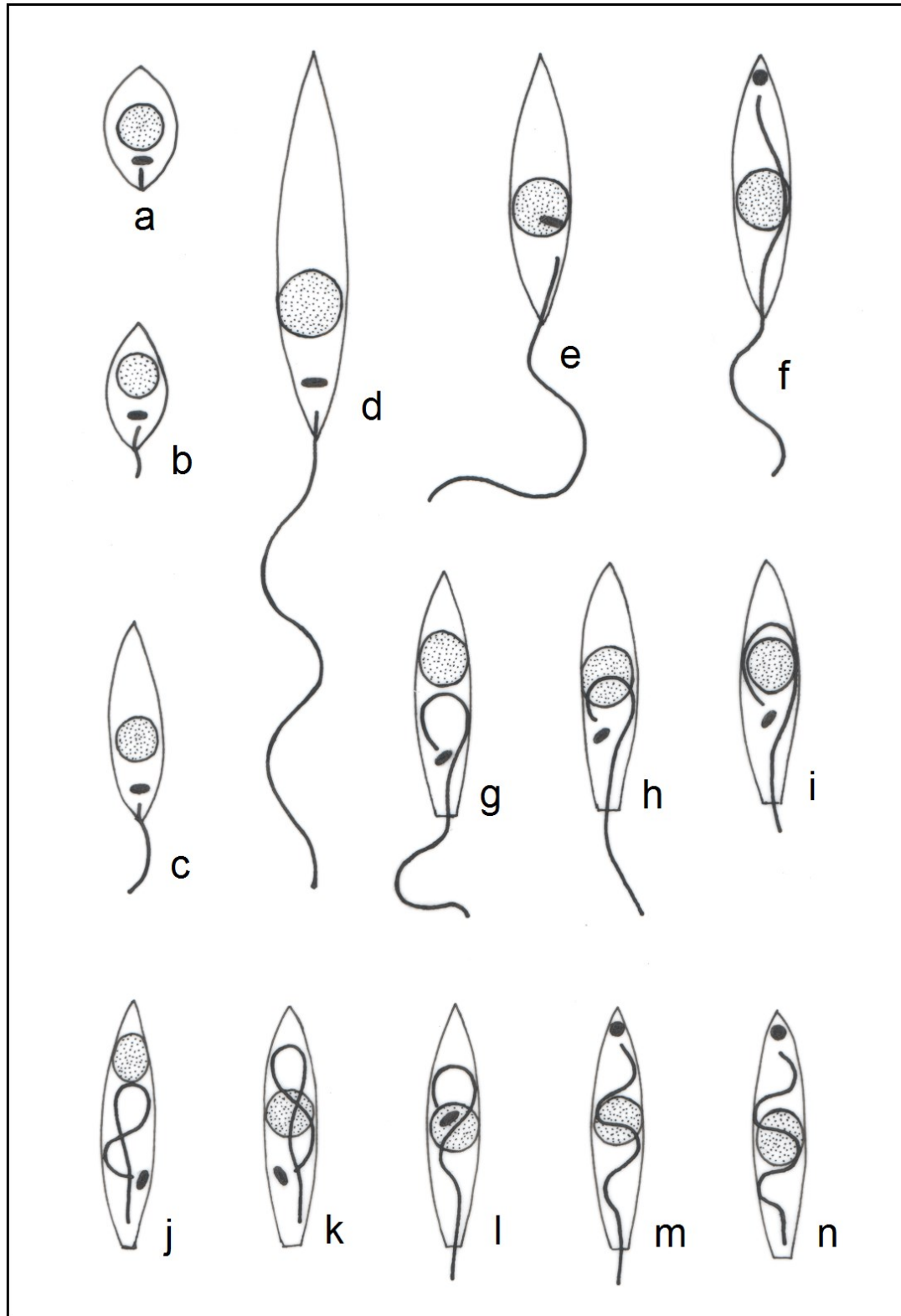


Figura 1. Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma promastigota no ciclo de vida.

Amastigota (a). Transição entre amastigota e promastigota (b)

Promastigota (c, d). Paramastigota (e).

Endomastigota tipo 1 (g, h, j-l). Endomastigota tipo 2 (i).

Opistomastigota (f, m, n).

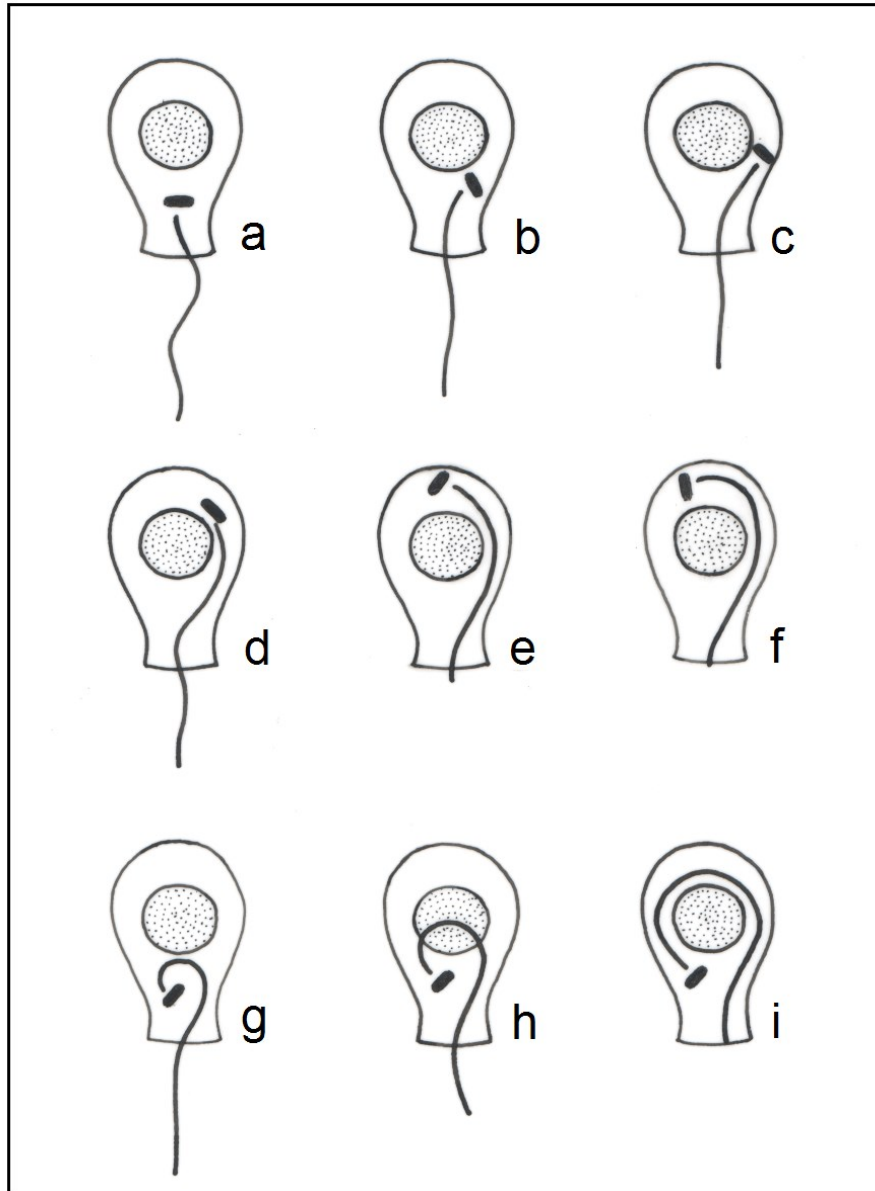


Figura 2. Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanomastigota (nomenclatura proposta).

Procoanomastigota (a, b). Paracoanomastigota (c).

Transição entre paracoanomastigota e metacoanomastigota (d).

Metacoanomastigota (= opistomorfa) (e).

Transição entre metacoanomastigota e endocoanomastigota (f).

Endocoanomastigota tipo 1 (g, h). Endocoanomastigota tipo 2 (i).

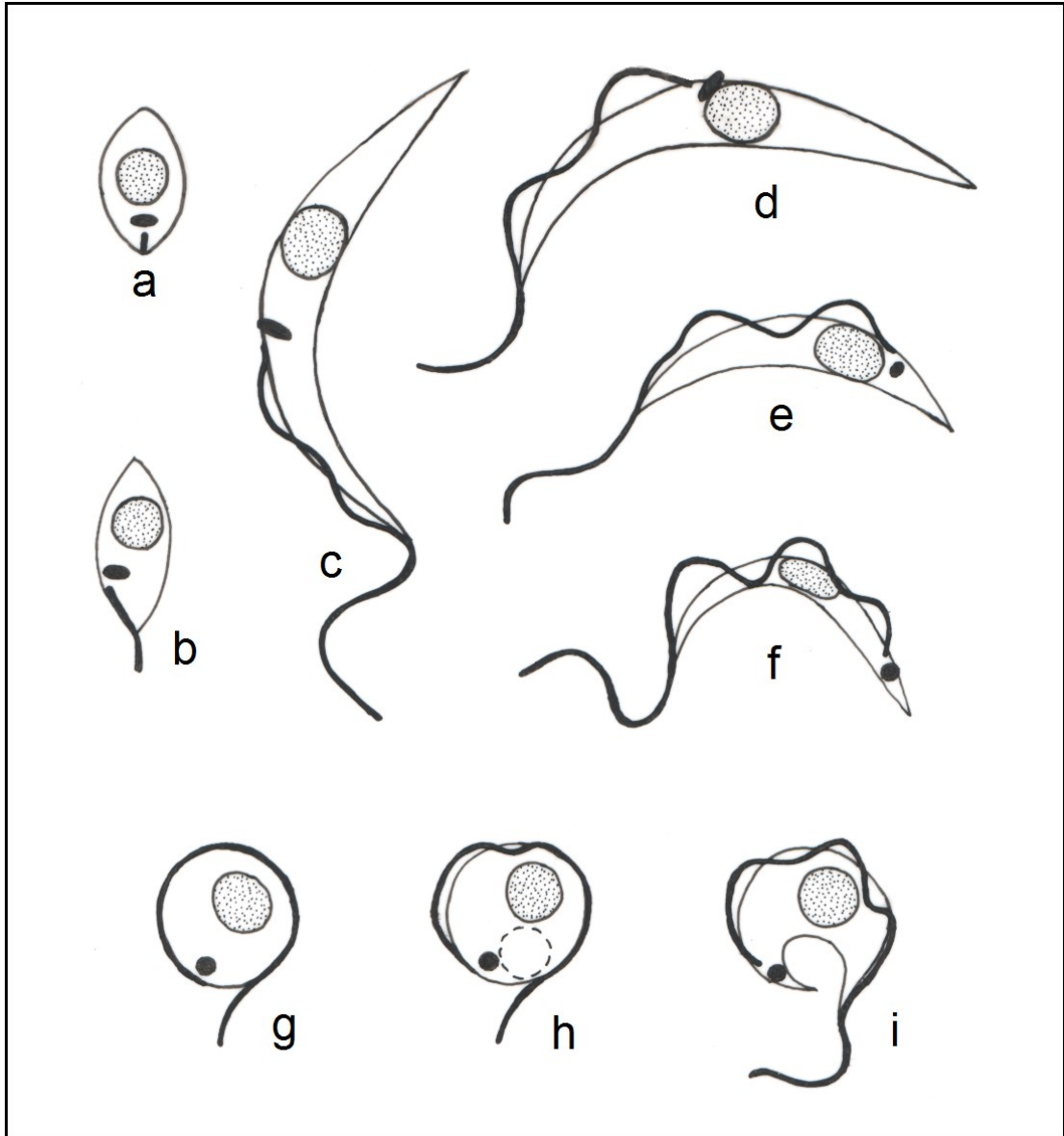


Figura 3. Representação esquemática de estágios evolutivos que podem ser encontrados em tripanosomatídeos dos gêneros *Blastocrithidia* e *Trypanosoma*.

Amastigota (a). Transição entre amastigota e epimastigota (b).

Epimastigota (c, d). Tripomastigota (e, f, i).

Esferomastigota (g).

Transição entre esferomastigota e tripomastigota ("desenrolamento") (h).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras analisadas

As amostras de tripanossomatídeos utilizadas neste trabalho estão relacionadas nas Tabelas I–V. Nestas tabelas citam-se o hospedeiro original da amostra, a procedência da cultura, seu número código na *American Type Culture Collection* (ATCC) e/ou na Coleção de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (CT-IOC) e as referências bibliográficas. Os organismos estudados encontram-se depositados nesta última coleção, sendo mantidos criopreservados em nitrogênio líquido.

A maioria das amostras foi estudada comparativamente em relação aos seguintes aspectos: (a) crescimento, padrão de diferenciação e divisão celular *in vitro*, (b) biometria dos seus diferentes estágios evolutivos, (c) ocorrência ou não de fenômenos sugestivos de sexualidade. As amostras apossimbióticas foram analisadas apenas em esfregaços corados pelo *Giemsa* de lâminas da "Coleção de Tripanosomatídeos" para apuração de ocorrência de células com cinetoplasto posnuclear. A chamada "*Herpetomonas*" *dedonderi* foi analisada apenas quanto à biometria de seus estágios evolutivos em diferentes fases de crescimento em meio LIT. No caso da amostra original de *Leptomonas wallacei*, realizou-se somente um estudo biométrico dos "cistos" flagelares encontrados em culturas em MWM. Já *L. wallacei*, clone B, foi estudada conforme acima citado.

2.2. Meios de cultura utilizados

Ao serem retirados do nitrogênio líquido, os organismos selecionados para este estudo foram sempre semeados em meio de cultura bifásico. A fase sólida continha 1,5% de agar (Difco 0140 ou Sigma A 1296) suplementado com 10% de sangue de carneiro. Como fase líquida utilizou-se um dos meios descritos a seguir (LIT, também chamado de LIT básico ou padrão, LIT 20% SFB, FYTSM e MWM) e sabidamente favoráveis ao crescimento de cada amostra. A manutenção das mesmas prosseguiu por repiques a cada 5–7 dias, utilizando-se o meio LIT para a maioria. As amostras que não cresceram neste meio foram mantidas em LIT 20% SFB, FYTSM ou MWM. Entretanto, visando uma melhor padronização das condições experimentais, antes da semeadura para o estudo comparativo, todas as amostras foram repicadas para o meio LIT ou LIT 20% SFB (as de crescimento difícil), exceto quando nestas condições não eram geradas células na quantidade previamente estabelecida para o início das culturas.

Meio LIT de Yeager (LIT básico ou padrão), LIT 20% SFB**(Chiari & Camargo 1984)**

<i>Liver infusion</i> (Difco 0269)	5,0 g
<i>Tryptose</i> (Difco 0124)	5,0 g
NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	8,0 g
Glicose (D+) (anidra)	2,0 g
Hemina (0,01 g/ml em NaOH 1N)	1,0 ml
Penicilina G potássica	200 U/ml
Soro fetal bovino (65–68°C, 1h)	100 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O pH foi ajustado a 7,2 com HCl ou NaOH 1N. O meio foi esterilizado por filtração utilizando-se um conjunto de pré-filtros e membranas Millipore™. Este meio, aqui chamado de LIT, LIT básico ou padrão, baseia-se na fórmula de Chiari & Camargo (1984). Ao receber mais 10% de soro fetal bovino estéril (inativado: 56°C, 30 min), passou a ser referido como LIT 20% SFB, e foi usado para possibilitar o crescimento de amostras que não cresciam em LIT.

Meio FYTSM**(fórmula de Roitman *et al.* 1972, ligeiramente modificada)**

<i>Yeast Extract</i> (Difco 0127)	5,0 g
<i>Tryptose</i> (Difco 0124)	5,0 g
Sacarose	20,0 g
Acido fólico	0,02 g
Hemina (0,01 g/ml em NaOH 1N)	1,0 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH ou HCl 1N. O meio foi esterilizado por autoclavação e após suplementado com 0,1 ml de penicilina G potássica (200.000 U/ml) e 15% de soro fetal bovino estéril e previamente inativado por 30 min a 56°C.

Meio de Warren, modificado (MWM)

<i>Brain Heart Infusion</i> (Difco 0037)	37,0 g
Ácido fólico	0,01 g
Hemina (0,01 g/ml em NaOH 1N).....	1,0 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O pH foi ajustado entre pH 7,0 e 7,2 com NaOH ou HCl 1N. O meio foi esterilizado por autoclavação e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por 30 min a 56°C.

2.3. Clonagem de amostras

Algumas das amostras que apresentavam grande polimorfismo foram clonadas (se necessário, reclonadas), utilizando-se um equipamento de citometria de fluxo (*Coulter's EPICS 751*). Os clones obtidos em placas de microtitulação de 96 poços (fundo redondo, 150 µl de LIT/poço) foram expandidos em tubos de ensaio com 4 ml de LIT. Os clones aqui estudados foram selecionados ao acaso. Estes são citados nas Tabelas I, II e IV.

2.4. Análise do crescimento em meio LIT ou LIT 20% SFB

O crescimento *in vitro* dos organismos utilizados neste trabalho foi acompanhado em meio LIT ou LIT 20% SFB (333 e 328 mOms, respectivamente), ambos da mesma partida. O LIT 20% SFB só foi utilizado para as espécies que não cresciam em LIT básico, a saber: *Herpetomonas muscarum ingenoplastis*, *Leptomonas mirabilis*, *Leptomonas* sp. (O.v.), *Phytomonas* sp. (E.c.) e *Phytomonas francai*. A amostra *Phytomonas* sp. (A.c.) cresceu precariamente nos dois meios e assim foi estudada em LIT.

Todas as culturas foram iniciadas com 2×10^6 células semeadas em 4 ml de meio LIT ou LIT 20% SFB, estes distribuídos em tubos de ensaio de 16×150mm com tampa rosqueada. A temperatura de incubação foi sempre de 27,3°C ($\pm 0,4^\circ\text{C}$). Na maioria das amostras, as células utilizadas na semeadura procederam de culturas de três dias em LIT. As exceções foram: *H. muscarum ingenoplastis*, *L. mirabilis* (quatro dias em LIT 20% SFB), *P. francai*, *Phytomonas* sp. (E.c.), *Leptomonas* sp. (O.v.) (três dias em MWM), *Phytomonas* sp. (A.c.) (três dias em FYTSM) e *Phytomonas* sp. (E.p.) (sete dias em FYTSM).

O crescimento das amostras foi estimado em número de células/µl em intervalos de 24 h, entre 48–144 h. As contagens foram feitas com hemocítômetros de Neubauer, em duplicata ou triplicata para extração da média do crescimento de cada amostra por intervalo de 24 h. Para comparação da intensidade do crescimento das amostras em estudo, utilizou-se a média aritmética dos números de células/µl, obtidos a cada 24 h, entre 48–144 h.

2.5. Coloração dos parasitas

Para os estudos biológicos, morfológicos e biométricos, foram colhidas alíquotas de cada amostra em intervalos de 24 h, entre 48–144 h de cultivo, visando o preparo de esfregaços a serem fixados com metanol, tratados com HCl à temperatura ambiente e após corados pelo *Giemsa*. O procedimento que utilizamos está detalhado a seguir, sendo uma adaptação de técnicas previamente descritas por Mühlpfordt (1963), Itikawa & Ogura (1964) e Carvalho (1973).

Esfregaços de cada cultura foram preparados sobre lâminas de vidro finas, secos ao ar e em seguida fixados com metanol por, no máximo, 10 min. Após descarte do metanol e secagem, as lâminas foram cobertas com HCl 5N por 15 min e, a seguir, exaustivamente lavadas sob um fluxo delicado de água corrente. Subseqüentemente, os esfregaços foram cobertos com uma solução de *Giemsa* (Merck, Sigma ou Reagen) diluída em tampão fosfato 0,02M, pH 7,2. A solução corante foi preparada utilizando-se usualmente 2–3 gotas de *Giemsa* por ml de tampão. Em geral, os esfregaços foram corados durante 90 min, mas na dependência da marca ou partida do *Giemsa*, houve necessidade de ajustes no tempo de coloração, ou mesmo no número de gotas/ml. A seguir, as lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente e postas para secar. Sua montagem foi feita utilizando-se resina Permount™ (Fisher) e lamínulas finas. Todas as observações dos esfregaços corados foram realizadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000×).

2.6. Diferenciação e divisão celular em meio LIT ou LIT 20% SFB

Analisou-se o padrão de diferenciação celular das diferentes amostras entre 48–144 h, determinando-se os percentuais dos diferentes estágios evolutivos em intervalos de 24 h após exame, em geral, de pelo menos 500 células selecionadas ao acaso em lâminas coradas pelo *Giemsa* (exceções indicadas nas tabelas de resultados). Cada estágio evolutivo foi identificado com base na forma do corpo celular, na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, na presença/ausência de flagelo livre e no percurso intracelular do flagelo (Figs 1, 2). Observou-se também a presença/ausência de células binucleadas, biflageladas, espiraladas, ou subtipos bem definidos, contabilizando-se seus percentuais quando sua presença era notória nas lâminas em estudo. A média aritmética dos percentuais de cada estágio/24 h foi empregada para comparação do padrão de diferenciação das amostras em estudo. Arbitrou-se que dois estágios eram predominantes quando a diferença entre suas taxas era $\leq 5,0\%$.

Também determinaram-se os percentuais dos diferentes tipos de divisão examinando-se, em geral, pelo menos 50 células em processo de divisão encontradas durante a análise da diferenciação celular feita entre 48–144 h, em intervalos de 24 h. Para identificação de cada tipo de divisão considerou-se a posição de um núcleo em relação ao outro, além da posição dos cinetoplastos em relação aos núcleos; foram também computadas as divisões peculiares em que um ou ambos os flagelos eram curvados intracelularmente. Não foram contabilizadas as células em divisão cujo tipo não pôde ser definido. Arbitrou-se que dois tipos de divisão eram predominantes quando a diferença entre suas taxas era $\leq 10,0\%$.

A Fig. 4 ilustra os principais tipos de divisão encontrados em tripanosomatídeos com a forma coanomastigota. Este esquema pode também ilustrar o processo de divisão nos demais tripanosomatídeos em estudo, desde que se considere apenas a posição dos núcleos e cinetoplastos e excetuem-se as formas com flagelo curvado intracelularmente.

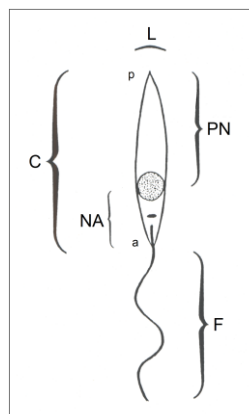
2.7. Análise morfométrica dos diferentes estágios evolutivos

Os diferentes estágios evolutivos encontrados nas amostras listadas nas Tabelas I–V, com exceção daquelas citadas no item 2.1, foram analisados biometricamente.

As medidas de cada estágio dos tripanosomatídeos aqui estudados foram tomadas em centímetros, utilizando-se uma régua ou curvímetro, diretamente nos desenhos obtidos com auxílio de uma câmara clara acoplada a um microscópio óptico. Durante a realização destes desenhos, a câmara clara foi mantida a uma distância constante da mesa de trabalho, na qual ficava o protocolo para o registro dos desenhos. Estes eram cópias fiéis das células visualizadas, todas procedentes de esfregaços corados pelo *Giemsa* com ampliação de 1.000× (objetiva de imersão). Nesta condição, também se copiou no protocolo de desenhos, com auxílio de uma lâmina micrométrica de referência, uma escala que representava 10µm. Em nossas condições, todos os desenhos originais foram obtidos na mesma escala, onde 10µm correspondiam a 1,4cm nos protocolos de trabalho. Com base neste conhecimento, determinou-se o fator de multiplicação necessário à transformação para micrômetros de todas medidas obtidas em centímetros.

Os parâmetros biométricos analisados em cada estágio evolutivo estão ilustrados na figura abaixo, na qual também estão indicadas as extremidades anterior (**a**) e posterior do parasita (**p**):

- comprimento do corpo celular sem o flagelo livre (**C**),
- largura do corpo na porção mais larga (**L**),
- comprimento da porção livre do flagelo (**F**),
- distância da extremidade posterior do parasita a meio do núcleo (**PN**),
- distância do meio do núcleo à extremidade anterior (**NA**). Determinou-se também a razão comprimento/largura do corpo (**C/L**), além do índice nuclear (**IN**), o qual representa a razão **PN/NA** (Dias & Freitas 1943) e expressa a posição do núcleo no corpo celular.



Calculou-se a média aritmética e o desvio padrão dos dados obtidos por amostragem do estágio evolutivo analisado. De cada espécie ou isolado, geralmente foram medidas 50 células com cinetoplasto antenuclear; dos demais estágios mediram-se 30 formas ou menos, quando estes eram mais raros. No presente estudo, introduzimos o **índice C/L** para comparar a largura relativa de tripanosomatídeos de diferentes grupos. Assim sendo, quanto maior o **C/L**, mais alongado era o corpo do parasita, quanto menor, mais alargado.

2.8. Pesquisa de formas e pares peculiares sugestivos de fenômenos de sexualidade

Na maioria das espécies utilizadas neste estudo foram examinadas, em geral, pelo menos 2.500 células coradas pelo Giemsa selecionadas ao acaso entre 48-144 h de cultivo (~500 células/intervalo de 24 h) com o objetivo de determinar os percentuais de formas, pares peculiares e células anucleadas. Em espécies de crescimento difícil a extremamente difícil, como *L. costoris*, *L. mirabilis*, *Phytomonas* sp. (A.c.), *Phytomonas* sp. (E.c.) e *P. francai*, foram examinadas, respectivamente, um total de 1.737, 734, 1.306, 1.520 e 1.634 células (estas também encontradas entre 48-144 h/intervalos de 24 h).

A identificação das formas e pares peculiares acima citados baseou-se nos achados de Sousa (1994a, 1997) e Sousa *et al.* (1997a) em espécies de *Herpetomonas* e em *Leishmania major* (Sousa *et al.* 1997b). Nestes trabalhos, tais formas e pares foram interpretados como parte de fenômenos sugestivos de sexualidade.

Para facilitar a exposição dos achados no presente trabalho, as células peculiares foram designadas de acordo com a sua forma, a qual podia assemelhar-se a um "sino", "jarra" ou "chupeta" (Figs 5-10, 14, 15, 18, 25-27, indicadas com ★). Também arbitrou-se designar os pares peculiares como tipos 1 ou 2. Os pares do tipo 1 eram geralmente constituídos por promastigotas apostas (mas outros estágios podiam ocorrer), unidas pelas extremidades posteriores, nas quais usualmente ocorria um alargamento ou uma "linha" mais corada pelo Giemsa, a qual em certos pares lembrava um "anel" (Figs 29 A-B, 30 A-C). Os pares do tipo 2 eram constituídos por uma forma alongada (geralmente promastigota) aderida pela sua extremidade posterior a uma célula semelhante a "sino", "jarra" ou "chupeta" (Fig. 29 C).

Também procurou-se verificar se as taxas relativamente elevadas de células sem núcleo (mas com cinetoplasto e flagelo) encontradas em algumas culturas eram acompanhadas por freqüentes divisões celulares anômalas ou pela presença de pares peculiares (tipos 1 ou 2) nos quais parecia ocorrer transferência de núcleo de uma célula para a outra.

TABELA I

TRIPANOSOMATÍDEOS QUE APRESENTAM A FORMA COANOMASTIGOTA (§) IDENTIFICADOS COMO *CRITHIDIA*

Amostras	Hospedeiro (*)	Procedência	ATCC	CT-IOC	Referências bibliográficas
<i>Crithidia fasciculata</i> (cepa <i>Anopheles</i>)	<i>Anopheles quadrimaculatus</i> (Diptera: Culicidae)	ATCC	11745	048	Noguchi & Tilden 1926 Wallace & Johnson 1961
<i>Crithidia fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>)	<i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae)	ATCC	12857	050	Wallace 1943; Wallace & Johnson 1961
<i>Crithidia guilhermei</i>	<i>Phaenicia cuprina</i> (Diptera: Calliphoridae)	(A)	----	051	Soares <i>et al.</i> 1986
<i>Crithidia luciliae</i>	<i>Phaenicia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	(B)	30258	053	Wallace & Clark 1959
<i>Crithidia ricardo</i> (original e clone 1A) (♠)	<i>Culex saltanensis</i> (Diptera: Culicidae)	(C)	----	184	Sibajev <i>et al.</i> 1993
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (♠)	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(D)	----	213	Santos <i>et al.</i> 1994
<i>Crithidia flexonema</i> (clone 7E) (♠)	<i>Gerris remigis</i> (Hemiptera: Gerridae).	ATCC	50211	231	Wallace <i>et al.</i> 1960
<i>Crithidia mellificae</i>	<i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae)	ATCC	30254	035	Langridge & Mcghee 1967
<i>Crithidia hutneri</i>	<i>Cosmoclopius</i> sp. (Hemiptera: Reduviidae)	ATCC	30818	018	Roitman <i>et al.</i> 1977
<i>Crithidia</i> sp. (Z.I.) (clone 6G) (♠)	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	(E)	----	193	Sá-Xavier <i>et al.</i> 1998 (**)
<i>Crithidia luciliae thermophila</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	(F)	30817	054	Carvalho 1973; Roitman <i>et al.</i> 1977
<i>Crithidia hamosa</i>	<i>Euryophthalmus davidi</i> (Hemiptera: Pyrrhocoridae)	ATCC	30256	017	Mcghee <i>et al.</i> 1969
<i>Crithidia acanthocephali</i>	<i>Acanthocephala femorata</i> (Hemiptera: Coreidae)	(F)	30251	042	Hanson & Mcghee 1961

(§) isolados de insetos, com exceção de *Crithidia* sp. (C.t.) isolada de *Chamaesyce thymifolia* (♠), inicialmente identificada como *Phytomonas*, mas confirmada como *Crithidia* (M.A. Sousa & A. Romeiro, não publicado). (*) nomes científicos dos hospedeiros seguem a publicação original. (**) Ver Anexo 7.3.7.

(♠) clones obtidos na Coleção de Tripanosomatídeos a partir da amostra original.

ATCC: *American Type Culture Collection*, número código. CT-IOC: *Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz*, número código.

Procedência: (A) J. Angluster, (B) L. M. Previato, (C) A. Sibajev, (D) A. Romeiro, (E) M. P. Deane/N. Thomaz, (F) E. P. Camargo/M. Teixeira.

TABELA II
TRIPANOSOMATÍDEOS (ISOLADOS DE INSETOS OU PLANTAS) QUE APRESENTAM A FORMA
COANOMASTIGOTA E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Amostras	Hospedeiro (*)	Procedência	ATCC	CT-IOC	Referências bibliográficas
<i>Wallaceina inconstans</i> (= <i>Proteomonas</i>) (clone 4C) (♠)	<i>Calocoris sexguttatus</i> (Hemiptera: Miridae)	(G)	---	192	Podlipaev <i>et al.</i> 1990 Podlipaev & Rokitskaya 1999 Bulat <i>et al.</i> 1999
<i>Wallaceina brevicula</i> (= <i>Proteomonas</i>) (clone 11E) (♠)	<i>Nabis brevis</i> (Hemiptera: Nabidae)	(G)	---	182	Frolov & Malisheva 1989 Podlipaev <i>et al.</i> 1990 Bulat <i>et al.</i> 1999
<i>Angomonas deanei</i> (= " <i>Crithidia</i> " <i>deanei</i>) (★)	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	(F)	30255	044	Carvalho 1973 Sousa & Côrte Real 1991
<i>Angomonas deanei</i> (= " <i>Crithidia</i> " <i>deanei</i>) (apossimbiótica)	---	(H)	---	248	Lima <i>et al.</i> 1997
" <i>Crithidia</i> " <i>desouzai</i> (★)	<i>Ornidia obesa</i> (Diptera: Syrphidae)	(F)	---	109	Fiorini <i>et al.</i> 1989
" <i>Herpetomonas</i> " <i>roitmani</i> (clone 7E) (♠) (★)	<i>Ornidia obesa</i> (Diptera: Syrphidae)	(I)	---	212	Fiorini <i>et al.</i> 1989 Faria-e-Silva <i>et al.</i> 1991
" <i>Crithidia</i> " <i>oncopelti</i> (★) (♠)	<i>Asclepias syriaca</i> (Plantae: Asclepiadaceae)	ATCC	12982	055	Noguchi & Tilden 1926 Thomson & Robertson 1932 Newton & Horne 1957
" <i>Crithidia</i> " <i>oncopelti</i> (apossimbiótica)	---	ATCC	30264	019	Chang 1974
" <i>Herpetomonas</i> " <i>dedonderi</i> (original) (♠)	<i>Haemagogus janthinomys</i> (Diptera: Culicidae)	(F)	---	060	Dedet <i>et al.</i> 1986 Camargo <i>et al.</i> 1996 (**)

(*) nomes científicos dos hospedeiros seguem a publicação original. (**) Ver Anexo 7.3.4. (♠) clones obtidos na Coleção de Tripanosomatídeos a partir da amostra original. (★) amostras com endossimbionte. (♠) a origem desta amostra é pouco clara, mas é possível que tenha sido isolada de *Asclepias syriaca* (cepa nº 4 obtida de *A. syriaca* nº 213 por Noguchi & Tilden (1926)); na ocasião foi denominada de *Herpetomonas oncopelti*, mas com toda probabilidade era uma mistura de amostras, tendo a espécie aqui citada sobrepujado a(s) outra(s) durante a manutenção da cultura.

(♠) nesta espécie, as coanomastigotas só foram frequentes a partir das 72 h de cultivo em LIT.

ATCC: *American Type Culture Collection*, número código. CT-IOC: *Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz*, número código.

Procedência: (F) E. P. Camargo/M. Teixeira, (G) M. Teixeira/S. A. Podlipaev, (H) M. C. M. Motta, (I) P. M. Faria-e-Silva.

TABELA III

TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS OU PLANTAS E IDENTIFICADOS COMO *HERPETOMONAS*.

Amostras	Hospedeiro (*)	Procedência	ATCC	CT-IOC	Referências bibliográficas
<i>Herpetomonas pessoai</i> (= <i>H. samuelpessoai</i>)	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	(A)	30252	067	Galvão <i>et al.</i> 1970; Carvalho 1973 Carvalho & Deane 1974; Roitman <i>et al.</i> 1976 Levine 1978; Bulat <i>et al.</i> 1999
<i>Herpetomonas anglusteri</i>	<i>Liopygia ruficornis</i> (Diptera: Sarcophagidae)	(J)	----	059	Fiorini <i>et al.</i> 1989
<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	<i>Muscina stabulans</i> (Diptera: Muscidae)	(K)	30708	062	Yoshida <i>et al.</i> 1978 ^a
<i>Herpetomonas megaseliae</i>	<i>Megaselia scalaris</i> (Diptera: Phoridae)	ATCC	30209	033	Dagget <i>et al.</i> 1972
<i>Herpetomonas muscarum muscarum</i>	<i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae)	ATCC	30260	020	Rogers & Wallace 1971; Wallace <i>et al.</i> 1973
<i>Herpetomonas muscarum ingenoplastis</i>	<i>Phormia regina</i> (Diptera: Calliphoridae)	ATCC	30259	021	Rogers & Wallace 1971; Wallace <i>et al.</i> 1973
<i>Herpetomonas davidi</i> (isolado de McGhee & Postell) (♦) (⊙)	<i>Euphorbia cyathophora</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(F)	30287	077	McGhee & Postell 1976; Dollet 1984 Camargo <i>et al.</i> 1987, 1992
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (♦)	<i>Euphorbia hyssopifolia</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(L)	50166	175	Attias & De Souza 1986 Sousa <i>et al.</i> 1997c, 1998c
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (♦)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Plantae: Solanaceae)	(M)	----	229	Fiorini <i>et al.</i> 1986; Sousa <i>et al.</i> 1997d
<i>Herpetomonas</i> sp. (L.s)	<i>Leptoglossus stigma</i> (Hemiptera: Coreidae)	(M)	----	221	Brazil <i>et al.</i> 1991; Sousa <i>et al.</i> 1997d

(*) nomes científicos dos hospedeiros seguem a publicação original. (♦) isolados de plantas. (⊙) apesar de identificada como "*Phytomonas*" *davidi* por McGhee & Postell (1976), esta amostra não corresponde àquela estudada por Lafont (1910) e França (1914, 1919, 1920, 1921). Camargo *et al.* (1992) a identificaram como *Herpetomonas*.

ATCC: *American Type Culture Collection*, número código. CT-IOC: *Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz*, número código.

Procedência: (A) J. Angluster, (F) E. P. Camargo/M. Teixeira, (J) M. J. Soares, (K) A. J. Romanha, (L) V. Jankevicius/S. Itow-Jankevicius, (M) J. E. Fiorini.

TABELA IV
TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO LEPTOMONAS

Amostras	Hospedeiro (*)	Procedência	ATCC	CT-IOC	Referências bibliográficas
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) (isolado IM 3943, clone) (✧)	<i>Lutzomyia ayrozai</i> (Diptera: Psychodidae)	(N)	---	100	Sousa <i>et al.</i> 1998a (**)
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) (isolado IM 3944, clone) (✧)	<i>Lutzomyia ayrozai</i> (Diptera: Psychodidae)	(N)	---	058	Sousa <i>et al.</i> 1998a (**)
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	<i>Pyrrocoris apterus</i> (Hemiptera: Pyrrhocoridae)	ATCC	30974	026	Zotta 1912, 1921 (***) Wallace & Peng 1978 (***)
<i>Leptomonas seymouri</i>	<i>Dysdercus suturellus</i> (Hemiptera: Pyrrhocoridae)	(K)	30220	277	Wallace 1977b
<i>Leptomonas collosoma</i>	<i>Gerris dissortis</i> (Hemiptera: Gerridae)	(F)	30261	073	Wallace <i>et al.</i> 1960
<i>Leptomonas costoris</i>	<i>Gerris comatus</i> (Hemiptera: Gerridae)	ATCC	30262	022	Wallace <i>et al.</i> 1965
<i>Leptomonas samueli</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	(B)	30971	074	Carvalho 1973
<i>Leptomonas lactosovorans</i>	<i>Zelurus martinsi</i> (Hemiptera: Reduviidae)	ATCC	30970	023	Manaia <i>et al.</i> 1981
<i>Leptomonas mirabilis</i>	<i>Cynomyopsis cadaverina</i> (Diptera: Calliphoridae)	ATCC	30263	024	Wallace & Todd 1964
<i>Leptomonas pulexsimulantis</i>	<i>Pulex simulans</i> (Siphonaptera: Pulicidae)	ATCC	50186	025	Beard <i>et al.</i> 1989
<i>Leptomonas wallacei</i> (original)	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera: Ligaeidae)	(D)	---	194	Romeiro <i>et al.</i> 2000
<i>Leptomonas wallacei</i> (clone B)	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera: Ligaeidae)	(D)	---	288	Romeiro <i>et al.</i> 2000
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (isolado 36/429 TD) (✧)	<i>Oncopeltus varicolor</i> (Hemiptera: Ligaeidae)	(O)	---	094	Takata <i>et al.</i> 1996 Romeiro <i>et al.</i> 2000

(*) nomes científicos dos hospedeiros seguem a publicação original. (**) Ver Anexo 7.3.10. (***) *apud* T. A. Nerad (ATCC Catalogue of Protists, 1993). (✧) clones obtidos na Coleção de Tripanosomatídeos a a partir da amostra original. (✧) identificada como *Leptomonas oncopelti* por Romeiro *et al.* (2000)

ATCC: American Type Culture Collection, número código. CT-IOC: Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, número código.

Procedência: (B) L. M. Previato, (D) A. Romeiro, (F) E. P. Camargo/M. Teixeira, (K) A. J. Romanha, (N) T. V. Barrett, (O) R. Milder.

TABELA V
TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE PLANTAS E IDENTIFICADOS COMO *PHYTOMONAS*

Amostras	Hospedeiro (*)	Procedência	ATCC	CT-IOC	Referências bibliográficas
<i>Phytomonas serpens</i> (isolado 9T)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Plantae: Solanaceae)	(L)	----	189	Jankevicius <i>et al.</i> 1989
<i>Phytomonas</i> sp. (C.b.)	<i>Citrus bergamia</i> (Plantae: Rutaceae)	(F)	----	080	Conchon <i>et al.</i> 1989
<i>Phytomonas macgheei</i> (isolado 163M, clone A) (⌘)	<i>Zea mays</i> (Plantae: Graminae)	(L)	----	181	Itow-Jankevicius <i>et al.</i> 1993 Teixeira <i>et al.</i> 1996, 1997 Sousa <i>et al.</i> 1997c, 1998c
<i>Phytomonas</i> sp. (A.c.)	<i>Allamanda cathartica</i> (Plantae: Apocynaceae)	(F)	----	079	Kastelein <i>et al.</i> 1984
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1)	<i>Euphorbia pinea</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(F)	----	082	Dollet <i>et al.</i> 1982
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2)	<i>Euphorbia characias</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(P)	----	292	Dollet 1984
<i>Phytomonas francai</i>	<i>Manihot esculenta</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(Q)	----	011	Vainstein & Roitman 1986
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.)	<i>Jathropa macrantha</i> (Plantae: Euphorbiaceae)	(F)	----	083	Burstein & Romero 1956

(*) nomes científicos dos hospedeiros seguem a publicação original.

(⌘) inicialmente identificada como *Herpetomonas macgheei*, esta amostra foi isolada de *Zea mays* experimentalmente infectada por *Leptoglossus zonatus* naturalmente infectado.

ATCC: *American Type Culture Collection*, número código. CT-IOC: *Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz*, número código.

Procedência: (F) E. P. Camargo/M. Teixeira, (L) V. Jankevicius/S. Itow-Jankevicius, (P) M. Dollet, (Q) M. Attias.

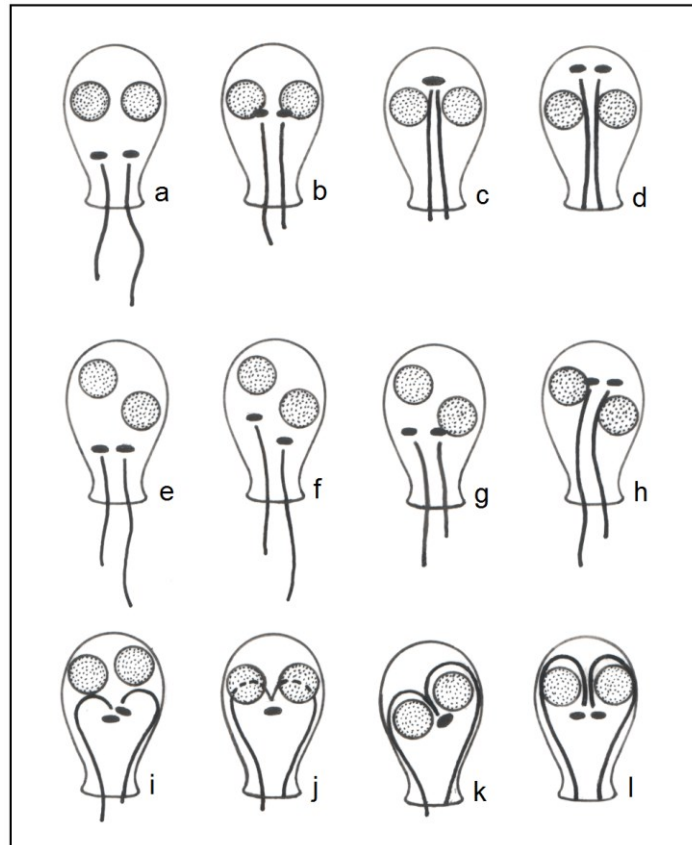


Figura 4. Representação esquemática dos tipos de divisão celular que podem ser encontrados em tripanosomatídeos que apresentam a forma coanostigota. Divisões com núcleos e cinetoplastos no mesmo plano, estes últimos sendo ante- (a), para- (b) ou posnucleares (c, d). Divisões com núcleos em diferentes planos e cinetoplastos antenucleares (e, f), um ante- e o outro parainuclear (g) ou um para- e o outro posnuclear (h). Divisões com os flagelos curvados intracelularmente (no estágio de endocoonastigota) tendo os núcleos no mesmo (j, l) ou em diferentes planos (i, k).

3. RESULTADOS

3.1. Crescimento em LIT ou LIT 20% SFB de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros

As Tabelas VI–IX apresentam os dados sobre o crescimento das amostras estudadas em meio LIT (fórmula padrão) ou LIT 20% SFB (item 2.2). O crescimento está expresso pela média de número de células/ μl entre 48–144h, determinado em intervalos de 24 h. Para facilitar comparações, arbitrou-se definir os níveis de crescimento em cultura de cada amostra com base nas médias obtidas, conforme acima citado. Assim, estabeleceu-se que em meio LIT, o crescimento seria considerado: **muito difícil** (< 5.000 células/ μl), **difícil** (5.001–15.000 células/ μl), **razoável** (15.001–25.000 células/ μl), **bom** (25.001–45.000 células/ μl), **muito bom** (45.001–70.000 células/ μl) e **excelente** (> 70.000 células/ μl). As amostras que só se multiplicaram em LIT 20% SFB, foram consideradas de crescimento **extremamente difícil**.

Nas amostras que possuem a forma coanomastigota, a intensidade de crescimento em LIT variou entre bom e excelente. *C. luciliae thermophila*, *C. acanthocephali*, *A. deanei* (= "*C. deanei*"), "*C. desouzai*" e "*H. roitmani*" apresentaram crescimento excelente. *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. flexonema*, *Crithidia* sp. (C.t.), "*C. oncopelti*" e as espécies de *Wallaceina* foram as que apresentaram crescimento menos intenso (Tabela VI).

Com exceção da chamada *H. muscarum ingenoplastis*, a qual não cresceu em LIT e apresentou crescimento extremamente difícil mesmo em LIT 20% SFB, as demais espécies classificadas como *Herpetomonas*, tanto procedentes de insetos quanto de plantas, apresentaram crescimento bom ou muito bom (Tabela VII), tal como diversas as amostras do gênero *Crithida* confirmadas como espécies deste grupo no presente trabalho (Tabela VI, ☆).

Grande heterogeneidade na intensidade de crescimento foi observada entre as amostras classificadas como *Leptomonas* (Tabela VIII). Algumas espécies, como *L. pyrrhocoris* e *L. seymouri*, apresentaram crescimento excelente, com médias superiores àquelas encontradas nas chamadas *Herpetomonas* (excluindo *H. m. ingenoplastis*) e em *Crithidia* (Tabelas VI, ☆, VII). Outras, como *Leptomonas* sp. (L.a.-1), *L. collosoma*, *L. samueli* e *L. lactosovorans*, revelaram crescimento bom ou muito bom, enquanto *L. costoris*, *L. pulexsimulnatis* tiveram crescimento difícil ou muito difícil em LIT, respectivamente. Já *L. mirabilis* e *Leptomonas* sp. (O.v.) apresentaram crescimento difícilimo, exigindo LIT 20% SFB.

As espécies de *Phytomonas* também apresentaram grande heterogeneidade em relação à intensidade de crescimento, que variou entre bom, em *P. serpens* e *Phytomonas* sp. (C.b.), a extremamente difícil, em *Phytomonas* sp. (E.c.) e *P. francai*, exigindo LIT 20% SFB. Ver Tabela IX.

3.2. Diferenciação celular em LIT ou LIT 20% SFB de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros

Entre os dados apresentados nas Tabelas VI–IX estão as médias dos percentuais dos diferentes estágios evolutivos encontrados nas espécies analisadas entre 48–144 h de cultivo, em intervalos de 24 horas. Na presente análise, arbitramos que um ou dois estágios seriam considerados predominantes, quando as médias de suas taxas fossem mais elevadas do que as dos demais e a diferença entre elas era $\leq 5,0\%$. Nas tabelas acima citadas, os percentuais dos estágios predominantes estão destacados.

3.2.1. Diferenciação em tripanosomatídeos com a forma coanomastigota e classificados em diferentes gêneros

As amostras com a forma coanomastigota revelaram nítida heterogeneidade quanto ao padrão de diferenciação celular, este expresso pelos percentuais (médias) dos diferentes estágios evolutivos (Tabela VI; Figs 5–12). Em *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. luciliae*, *C. ricardoii*, *C. flexonema*, *C. luciliae thermophila* e *Crithidia acanthocephali* predominam as procoanomastigotas. Em *C. mellificae*, *C. hutneri*, *Crithidia* sp. (Z.I.), *C. hamosa* e "*C.*" *oncopelti*, as paracoanomastigotas foram predominantes. Em *C. guilhermei* e *Crithidia* sp. (C.t.), predominaram os dois tipos acima, procoanomastigotas e paracoanomastigotas.

Em *A. deanei* (= "*C.*" *deanei*), "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*, os estágios predominantes foram as metacoanomastigotas (= opistomorfias), com taxas $> 55,0\%$ (Fig. 11, setas menores). Em algumas espécies, estas formas não foram encontradas, como em *Crithidia* sp. (C.t.), *C. hutneri* e *Crithidia* sp. (Z.I.), ou ocorreram em taxas $< 0,1\%$, como em *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei*, *C. flexonema*, *C. mellificae*, *C. luciliae thermophila*, *C. hamosa*, *C. acanthocephali* e *W. inconstans*. Taxas médias de metacoanomastigotas entre 0,5–0,7% foram observadas em *C. luciliae*, *C. ricardoii* e *W. brevicula*, enquanto em "*C.*" *oncopelti*, o percentual médio foi um pouco mais elevado (5,1%). A Tabela VI e as Figs 5 D, 6, 7 B, 8 A, 9 C, 10, 12 (setas menores) ilustram estes resultados. Curiosamente, em *C. ricardoii* (Fig. 6 A) e nas espécies de *Wallaceina* (Fig. 10), algumas metacoanomastigotas pareciam preceder a formação de endocoanomastigotas.

Nas duas espécies de *Wallaceina* predominaram as endocoanomastigotas, com taxas $> 53,0\%$ (Fig. 10, ☆). Em *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei* e "*C.*" *oncopelti*, estes estágios não foram encontrados, enquanto em *C. acanthocephali* e *A. deanei*, eles

ocorreram em percentuais $< 0,1$ (Tabela VI). Nas demais espécies, estas formas ocorreram em taxas médias que variaram entre 0,1–0,5%, em *Crithidia* sp. (C.t.), *C. flexonema*, *C. mellificae*, *C. hutneri*, *C. hamosa*, "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*, e entre 1,4–2,3%, em *C. luciliae*, *C. ricardoi*, *Crithidia* sp. (Z.l.) e *C. luciliae thermophila* (Tabela VI; Figs 5 D, 6, 7, 8, 9 A, B, 11 B, C, ☆).

Na maioria das amostras identificadas como *Crithidia*, como também nas duas espécies de *Wallaceina* (Tabela VI, indicadas com ☆), foram encontradas células aflageladas muito peculiares, com tendência à adesão (haptomonas) (Figs 5–10, indicadas com *). Estas eram freqüentemente menores e mais largas do que as flageladas, tendo o cinetoplasto principalmente paranuclear, o núcleo próximo da extremidade posterior do corpo, esta geralmente arredondada, e a extremidade anterior truncada e, às vezes, muito alargada. Tais formas podiam ser vistas isoladas, aos pares ou em grupos maiores, algumas vezes unidas pelas extremidades anteriores, formando rosetas (Figs 5–8, 10, *). Nestes grupos, também podiam ocorrer células em processo de divisão e até formas flageladas (Fig. 5 D, 6 A, 8 C, *). Diversas destas células coravam intensamente pelo Giemsa, principalmente em sua porção anterior. Considerando a soma dos percentuais das formas aflageladas com cinetoplasto ante- e paranuclear, tais células foram mais freqüentes em *C. flexonema* (9,5%), *C. fasciculata* (cepa *Anopheles*) (9,0%), *Crithidia* sp. (C.t.) (7,4%), *C. fasciculata* (cepa *Culex*) (7,3%), *W. brevicula* (4,0%), *C. ricardoi* (3,9%), *C. guilhermei* (3,5%) e *W. inconstans* (2,0%). Em outras espécies, suas taxas eram inferiores a 1,0%: *C. hutneri* (0,9%), *Crithidia* sp. (Z.l.) (0,8%), *C. luciliae* (0,5%), *C. hamosa* (0,3%) e *C. mellificae* (0,3%).

Em *C. acanthocephali*, formas aflageladas semelhantes foram geralmente vistas isoladas e em taxas médias mais baixas ($\sim 0,1\%$) (Fig. 9 C, *). Em *C. luciliae thermophila*, formas aflageladas também só foram encontradas isoladas, em taxas de 1,9% (média), predominando aquelas com cinetoplasto paranuclear (Fig. 9 A, *), mas algumas apresentavam o flagelo ligeiramente curvado, (Fig. 9 A, cabeças de seta). Tais formas, em geral, também coravam intensamente pelo Giemsa e pareciam ser uma fase de transição para endocoanomastigotas diferenciadas. A Tabela VI apresenta estes resultados.

Em *A. deanei*, "*C.*" *desouzai*, "*H.*" *roitmani* e "*C.*" *oncopelti*, não encontramos procoanomastigotas aflageladas, só paracoanomastigotas, estas geralmente isoladas e em taxas médias que variaram entre 0,4–1,6% (Tabela VI). Nas três primeiras espécies, os pares ou grupos de células aflageladas, ocasionalmente unidas pelas extremidades anteriores, incluíam, em geral, uma metacoanomastigota (Fig. 11 B). As formas aflageladas de "*C.*" *oncopelti* eram distintas de todas acima citadas, geralmente apresentando tamanho maior, núcleo mais anterior e formato do corpo peculiar, estreitado na porção posterior e alargado na anterior (Tabela XIX; Fig. 12, cabeça de seta).

Metacoanomastigotas aflageladas foram encontradas em taxas médias mais elevadas apenas em *A. deanei*, "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*, de 13,7%, 7,0% e 16,7%, respectivamente (Tabela VI; Fig. 11, setas menores). Em *C. ricardoi* e *W. brevicula*, estas formas ocorreram em percentuais inferiores (0,3% e 0,5%, respectivamente), enquanto nas demais espécies, elas não foram encontradas ou vistas em percentuais $< 0,1$. A Tabela VI apresenta estes resultados.

Endocoanomastigotas aflageladas só ocorreram em percentuais elevados em *W. inconstans* e *W. brevicula* (31% e 52%, respectivamente) (Fig. 10, ☆). Em *C. ricardoi*, estas formas ocorreram em taxas médias de 1,6% (Fig. 6 A, B, ☆). Nas demais espécies não foram encontradas ou ocorreram em taxas inferiores a 0,5% (Figs 5 D, 8 C, 9 A, B, ☆). Ver Tabela VI.

Em todas as amostras identificadas como *Crithidia* e nas duas espécies de *Wallaceina*, as procoanomastigotas e paracoanomastigotas flageladas apresentavam a extremidade posterior principalmente afilada, mas esta também podia ser arredondada. Estas últimas possuíam, em geral, o núcleo também em posição posterior (Figs 5 B–D, 6, 7 A, 8, 9 A, 10, indicadas com ▷) e pareciam ser derivadas das formas aflageladas acima descritas.

Uma curiosidade encontrada em algumas espécies de *Crithidia* era o formato peculiar da extremidade posterior de algumas células. Em *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), esta podia ser reta (Fig. 5 A, B, indicadas com ►). Já em *C. mellificae*, *C. hutneri* e *Crithidia* sp. (Z.1), a mesma podia ter aspecto prismático (Fig. 8, cabeças de seta) ou, como no caso da primeira espécie, ter uma reentrância (Fig. 8 A, ►).

Diferenciações no formato da extremidade posterior associadas a modificações na forma do corpo conferiam a diversas células um aspecto de "sino" ou "jarro" (Figs 5–8, 9 A, B, 10, 25, ★). Tais formas foram encontradas na maioria das espécies de *Crithidia* (exceção, *C. acanthocephali*) e em *W. inconstans*, ocorrendo em taxas médias que variaram de 0,2% (*C. fasciculata*, cepa *Anopheles*) a 8,9% (*C. fasciculata*, cepa *Culex*). Ver Tabela VI, "outros". Este tipo celular também podia ser encontrado em espécies classificadas em outros gêneros, principalmente *Herpetomonas* (Tabelas VII e XXVI).

Promastigotas e paracoanomastigotas flageladas com a extremidade posterior afilada podiam também ser encontradas nas amostras com simbiote, embora sendo mais raras em *A. deanei* e mais freqüentes em "*H.*" *roitmani* (Fig. 11). Em "*C.*" *oncopelti*, estas formas representavam a maioria da população (Fig. 12). Nas metacoanomastigotas (Fig. 12, setas menores) e células em divisão (Fig. 12, setas maiores) de "*C.*" *oncopelti*, observamos um nítido dimorfismo com relação ao formato da extremidade posterior, podendo esta ser gradualmente estreitada ou mesmo arredondada. Nesta espécie, algumas células em divisão apresentavam uma fissura na região posterior do corpo (Fig. 12, setas maiores), a qual sugeria o início da plasmotomia por esta extremidade. Os diversos pares de células unidas pelos

flagelos encontrados em "*C. oncopelti*" pareciam resultar deste tipo de divisão (Fig. 12, indicadas com ►). Em *C. hutneri* e *Crithidia* sp. (Z.l.) também foram observadas células em divisão com uma fissura na porção posterior (Fig. 8 B, C, setas maiores). A ocorrência desta fissura durante a divisão foi mais esporádica nas outras espécies.

Em algumas amostras, como *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei*, *Crithidia* sp. (C.t.), *W. inconstans* e *W. brevicula*, podiam ser vistas células binucleadas, mas com apenas um flagelo e um cinetoplasto, ou mesmo células cujo núcleo parecia alongar-se na direção do cinetoplasto para iniciar o processo de divisão (Figs 5 A–C, 6 A, 7 A, 10, indicadas com •). Estas últimas formas sugeriam a etapa inicial de uma divisão com os núcleos e cinetoplastos em diferentes posições (ante- e paranuclear).

3.2.2. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificadas no gênero *Herpetomonas*

Os dados da análise das amostras classificadas como *Herpetomonas* estão apresentados na Tabela VII. Em todas predominaram as promastigotas (Figs 14–16). Foram observadas taxas médias > 90,0% em *H. mariadeanei*, *H. muscarum ingenoplastis*, *Herpetomonas* sp. (S.l.) e *Herpetomonas* sp. (L.s.) e médias entre ~70,0–88,0% em *H. pessoai*, *H. anglusteri*, *H. muscarum muscarum*, *H. davidi* e *Herpetomonas* sp. (E.h). O menor percentual médio destas formas foi encontrado em *H. megaseliae* (64,4%).

Houve acentuada variação nas taxas médias de paramastigotas entre as espécies analisadas. As mais elevadas foram encontradas em *H. megaseliae* (30,5%) e *H. pessoai* (22,6%), e as menores em *H. mariadeanei* (2,2%), *Herpetomonas* sp. (L.s.) (1,4%), *Herpetomonas* sp. (S.l.) (1,1%) e *H. muscarum ingenoplastis* (0,5%). Nas demais, estas foram ~10,0%.

Os percentuais médios de opistomastigotas nas amostras classificadas como *Herpetomonas* foram baixos ou baixíssimos, o que é curioso, pois este seria um estágio de valor diagnóstico para o gênero. Médias superiores a 1% só ocorreram em três espécies: *H. anglusteri* (1,5%), *H. megaseliae* (1,3%) e *Herpetomonas* sp. (E.h.) (3,9%). Nas demais amostras, estas variaram entre 0,7% (*H. pessoai*) e menos de 0,1%, como em *H. muscarum ingenoplastis*, *Herpetomonas* sp. (S.l.) e *Herpetomonas* sp. (L.s.). A Tabela VII e as Figs 14–16 (setas menores) ilustram estes dados. É interessante assinalar, que em *H. mariadeanei*, as opistomastigotas mais pareciam uma etapa de transição para endomastigotas, de forma semelhante ao observado em *C. ricardoi* e espécies de *Wallaceina*.

Em nossas condições experimentais, endomastigotas só foram encontradas em quatro espécies classificadas como *Herpetomonas*: *H. pessoai* (0,08%), *H. mariadeanei* (0,1%), *Herpetomonas* sp. (E.h.) (0,6%) e *H. anglusteri* (1,9%); valores representam as médias (Figs 14 A–C, 16 B, ☆). Em

H. muscarum ingenoplastis, as células com flagelo enrolado intracelularmente diferiam das endomastigotas de outras espécies por serem grandes e alargadas, usualmente com núcleo pouco corado, e com formato do corpo às vezes irregular (Fig. 15 B, ☆).

Entre as amostras classificadas como *Herpetomonas*, estágios promastigotas ou paramastigotas aflagelados não foram encontrados ou só ocorreram taxas baixíssimas ($\leq 0,04\%$). Células biflageladas foram vistas em *H. mariadeanei* (0,4%) e, em percentual muito alto (55,1%), em *H. muscarum ingenoplastis* (Fig. 15, ★). Ver Tabela VII.

Com exceção de *H. anglusteri* e *H. muscarum ingenoplastis*, formas muito peculiares e semelhantes a um "sino" ou "jarro" (Figs 14 A, C, 16 A, C, 26, ★), ou mesmo a uma "chupeta" (Figs 16 C, 27 B, C, ►), foram encontradas nas demais amostras deste grupo em taxas médias que variaram de 0,1% [*H. megaseliae* e *Herpetomonas* sp. (L.s.)] a 1,6% [*Herpetomonas* sp. (E.h.)]. A Tabela VII ("outros") apresenta estes resultados. Ver possíveis correlações entre estes tipos celulares e alguns fenômenos sugestivos de sexualidade abordados no item 3.5.

Nas amostras classificadas como *Herpetomonas*, células com torções no corpo celular eram raras ou um pouco mais freqüentes em certos isolados, mas só com uma torção (Figs 14 B, 16 D). Embora não tenhamos calculado os percentuais de tais formas neste grupo, elas foram muito menos comuns do que em espécies de *Leptomonas* e *Phytomonas*.

3.2.3. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificadas no gênero *Leptomonas*

Nas amostras classificadas no gênero *Leptomonas*, as taxas médias de promastigotas foram geralmente superiores a 90,0%, com exceção de *L. costoris* (82,7%), *L. pulexsimulantis* (72,6%) e *L. mirabilis* (50,4%). Na maioria das amostras deste grupo, as médias dos percentuais de paramastigotas foram baixas, variando entre 0,6% (*L. samueli*) e 5,3% (*L. seymouri*), ou muito baixas ($< 0,1\%$), como em *Leptomonas* sp. (L.a.-2) e *Leptomonas* sp. (O.v.). As exceções foram *L. mirabilis* e *L. pulexsimulantis*, as quais apresentaram taxas médias de paramastigotas de 38,2% e 23,5%, respectivamente. Estes resultados estão detalhados na Tabela VIII e as ilustrações apresentadas nas Figs 17–21.

Opistomastigotas foram encontradas em *L. mirabilis* (1,2%), *L. lactosovorans* e *L. pulesimulantis* (0,2%) e em *L. samueli* (0,08%) (taxas médias) (Figs 19 A–C, 20, setas menores). Nenhuma amostra apresentou endomastigotas. Células tipo "sino" só foram encontradas em *L. collosoma* (média: 0,3%) (Fig. 18 C, ★).

Algumas espécies classificadas no gênero *Leptomonas* não apresentaram células aflageladas de qualquer tipo, como *Leptomonas* sp. (L.a.-1), *Leptomonas* sp. (L.a.-2), *L. pyrrocoris* e *L. seymouri*, ou estas ocorreram em percentuais $\leq 0,1$, como em *L. collosoma* e *L.*

samueli. As demais apresentaram formas aflageladas (promastigotas e paramastigotas somadas) em taxas médias de 5,8% (*L. pulexsimulantis*), 3,5% (*L. costoris*), 2,7% (*L. lactosovorans* e *L. wallacei*), 1,2% (*L. mirabilis*) e 0,64% em *Leptomonas* sp. (O.v.) (Figs 18 D, 19, 20, cabeças de seta). Opistomastigotas aflageladas só foram encontradas em *L. samueli* (0,08%) e em *L. lactosovorans* (0,1%) (Fig. 19 B, seta menor). A Tabela VIII detalha estes resultados.

A maioria das células aflageladas, tanto promastigotas quanto paramastigotas, encontradas nas espécies classificadas como *Leptomonas* possui a extremidade posterior afilada, o núcleo freqüentemente em posição central ou mais próximo da extremidade anterior do corpo, a qual, muitas vezes, é truncada, parecendo adaptadas à adesão (haptomonas) (Figs 18 D, 19, 20, 21, cabeças de seta). Em *L. costoris*, *L. mirabilis* e, muito freqüentemente, em *L. pulexsimulantis*, estas formas podiam ser vistas em grupos (Figs 18 D, 20, cabeças de seta).

Nas *Leptomonas* cistogênicas, as células aflageladas de pequenas dimensões, observadas em geral a partir de 96 ou 120 h de cultivo, foram identificadas como "cistos" flagelares livres e, assim sendo, não estão computadas na Tabela VIII (Fig. 20, barras finas menores, Fig. 21, ★). Em nossas condições experimentais, as taxas de cistos flagelares foram inferiores a 0,3%, considerando-se tanto os livres quanto os aderidos às células-mãe (Fig. 20, barras finas, Fig 21, seta maior e ★). Em *L. costoris* e *L. pulexsimulantis* (principalmente), algumas formas aflageladas ou com um pequeno flagelo podiam apresentar externamente, junto à extremidade anterior do corpo, uma região corada pelo Giemsa, a qual parecia material secretado pelo reservatório flagelar (Figs 18 D, cabeça de seta, Fig. 20, ►). Em *L. pulexsimulantis*, algumas células também apresentaram um alargamento incomum na extremidade distal do flagelo (não ilustrado). Nesta mesma espécie, também foram encontradas células flageladas muito pequenas, cujo cinetoplasto podia ser ante-, para- ou posnuclear, as quais pareciam derivadas dos cistos flagelares (Fig. 20, barras largas).

Nas três amostras de *Leptomonas* cistogênicas, observou-se um acentuado dimorfismo nas promastigotas flageladas e os tipos encontrados foram numerados de **1** a **4** para facilitar o entendimento de sua descrição (Tabela XVII). Em *L. pulexsimulantis*, um dos tipos era delgado, podendo apresentar uma ou mais torções no corpo (**tipo 1**; Fig. 20, ▷), enquanto o outro era alargado e menor (**tipo 2**; Fig. 20, ►); em ambos a extremidade posterior era afilada. Nas *Leptomonas* cistogênicas isoladas de insetos fitófagos, *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.), um dos tipos correspondia a uma promastigota comum (**tipo 3**; Fig. 21), enquanto o outro era alargado na extremidade posterior, sendo esta freqüentemente arredondada, o que conferia à célula um aspecto de raquete (**tipo 4**; Fig. 21, ►).

Em *L. wallacei*, observamos uma redução de tamanho do comprimento do corpo (C) com

aumento da largura (L) a partir das 96 h de cultivo (Tabela XXV; Fig. 21 A, barras finas), enquanto em *L. pyrrocoris* observamos que as promastigotas de 48 h eram menores do que as de 72 h (não ilustrado).

Células com uma ou mais torções no corpo, conferindo-lhes um aspecto espiralado, foram encontradas com frequência em algumas espécies classificadas como *Leptomonas*: *L. mirabilis* (88,3%), *L. costoris* (72,8%), *Leptomonas* sp. (O.v.) (54,4%), *L. pulexsimulantis* (28%) e *L. wallacei* (27,9%) (Figs 18 D, 19 C, 20, 21). Em *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.) e naquelas em que tais formas eram menos frequentes, elas apresentavam, em geral, apenas uma torção.

Promastigotas biflageladas, mas com um cinetoplasto e um núcleo, foram encontradas em algumas amostras em taxas que variaram entre 0,2% (*Leptomonas* sp. (L.a.-2)) e 3,4% (*L. costoris*) (Tabela VIII; Fig. 17 A, *). Em *Leptomonas* sp. (L.a.-1) e *Leptomonas* sp. (L.a.-2) também foram encontradas células binucleadas com apenas um flagelo, mas todas pareciam relacionadas com o início do processo de divisão (Fig. 17, ●). Na Fig. 17 B (●), observe a célula com o cinetoplasto também dividido e apresentando uma fissura na extremidade posterior do corpo.

3.2.4. Diferenciação celular em tripanosomatídeos classificados no gênero *Phytomonas*

Todas as amostras de *Phytomonas* analisadas apresentaram basicamente promastigotas, flageladas ou não (Tabela IX; Figs 22–24). Entre as características deste grupo, destacamos a acentuada variação no comprimento do flagelo (Tabela XVIII) e, em algumas espécies, também do corpo (Tabela XXV), além da ocorrência de células aflageladas peculiares originárias de uma divisão celular (Figs 22–24, setas maiores), as quais são sempre isoladas.

Tais células eram alongadas, usualmente menores que as flageladas (Tabela XXI), tendo as extremidades do corpo afiladas ou levemente arredondadas e o núcleo, em geral, mais próximo da região anterior (Figs 22–24, cabeças de seta menores). O processo de divisão celular também era bastante peculiar em *Phytomonas*, uma vez que usualmente originava células de tamanhos semelhantes, mas com acentuada diferença no comprimento dos flagelos, ou uma célula flagelada e a outra aflagelada (Figs 22–24, setas). Também ocorria divisão de células sem flagelo livre, que assim aumentavam em número (Figs 22 C, D, 23 B, 24 A, cabeças de seta maiores). As taxas médias de promastigotas aflageladas variou entre 0,8% (*P. francai*) e 52,5% (*Phytomonas* sp. (A.c.)). Em apenas duas amostras, encontramos paramastigotas, mas somente em taxas baixíssimas ($\leq 0,06\%$) (Tabela IX; Fig. 22 D, barra fina). Células tipo "sino" só foram observadas em *Phytomonas* sp. (E.c.) (Tabela IX, "outros 1"; média: 0,2%). Os dados biométricos das amostras aqui estudadas estão detalhados nas Tabelas XVIII, XXI e XXV (ver também item 3.4.1).

Promastigotas com uma ou mais torções no corpo foram encontradas em todas as

amostras: *Phytomonas* sp. (E.c.) (77,5%), *P. francai* (58,1%), *Phytomonas* sp. (E.p.) (57,8%), *P. macgheeii* (52,9%), *P. serpens* (49,3%), *Phytomonas* sp. (A.c.) (46,0%), *Phytomonas* sp. (J.m.) (38,6%) e *Phytomonas* sp. (C.b.) (33,2%); os valores representam as médias. Em nossas condições experimentais, o número de torções variou de 1–2 em *Phytomonas* sp. (C.b.) e *Phytomonas* sp. (A.c.), 1–3 em *P. macgheeii*, *P. francai* e *Phytomonas* sp. (J.m.), 1–4 em *Phytomonas* sp. (E.p.) e *Phytomonas* sp. (E.c.) e 1–5 em *P. serpens*. Entretanto, em todas as amostras predominaram as células com uma torção. Ver Figs 22–24.

Em *P. macgheeii*, mas principalmente em *P. francai* e *Phytomonas* sp. (J.m.), a partir de 96 ou 120 h de cultivo, observamos um gradual alargamento do corpo das promastigotas acompanhado de redução do seu comprimento, embora sem modificação apreciável no tamanho do flagelo (Tabela XXV). Algumas destas células tornavam-se elípticas ou arredondadas e podiam apresentar o flagelo (todo ou em parte) aparentemente aderido ao corpo, lembrando esferomastigotas (Figs 22 C, 24, barras finas). Os percentuais destas formas estão apresentados na Tabela IX ("outros 2"). Por outro lado, em *Phytomonas* sp. (E.p.), observamos gradual aumento do comprimento do corpo e do flagelo, do número de torções, sem alteração evidente na largura (Tabela XXV; Fig. 23 A, barra fina).

3.2.5. Diferenciação celular em tripanosomatídeos apossimbióticos e "*Herpetomonas*" *dedonderi*

Além das formas com cinetoplasto antenuclear e paranuclear, metacoanomastigotas também foram encontradas nas amostras apossimbióticas de *A. deanei* e "*C.*" *oncopelti*, este fato indicando que a diferenciação celular nestas espécies independe do endossimbionte bacteriano.

Na chamada "*H.*" *dedonderi*, observamos todos estágios evolutivos encontrados em *Crithidia*, inclusive as formas aflageladas peculiares (haptomonas) (Fig. 13 A, B, *). Entretanto, uma das peculiaridades desta espécie é a sua acentuada variação no comprimento e largura do corpo, com flutuação no comprimento do flagelo, em diferentes horas de cultivo em LIT (Tabela XXV; Fig. 13). Com 48 h de cultivo, a amostra apresentou predominantemente formas alongadas que mais se assemelhavam às promastigotas típicas de outros gêneros, como *Herpetomonas*. Nesta ocasião, também foram observadas diversas formas binucleadas (Fig. 13 A, •) e, ocasionalmente, pares peculiares de células apostas unidas pelas extremidades posteriores (Fig. 13 A, cabeça de seta). Formas coanomastigotas típicas tornaram-se gradualmente mais freqüentes a partir das 72 h de cultivo (Fig. 13 B) e, às 120 h, a amostra mais parecia um representante do gênero *Crithidia* (Fig. 13 C). Embora, nesta espécie, não tenhamos determinado os percentuais de metacoanomastigotas (Fig. 13, setas menores) e de endocoanomastigotas (Fig. 13 B, C, ☆), estas formas pareciam ocorrer em freqüência semelhante àquela das amostras de *Crithidia*.

TABELA VI
CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS QUE APRESENTAM A FORMA COANOMASTIGOTA (§) E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

O crescimento está expresso pela média do número de células/μl encontradas entre 48–144 h, em intervalos de 24 h. O padrão de diferenciação está expresso pela média dos percentuais dos diferentes estágios evolutivos determinados a cada 24 h, entre 48–144 h, após exame de pelo menos 500 células encontradas ao acaso em esfregaços corados pelo Giemsa. As amostras foram cultivadas em meio LIT básico (~27,3°C).

Amostras	Células/μl	Principais estágios evolutivos							Estágios sem flagelo livre (*)			
		pro	para	trans	meta	endo	outros	divisão	Pro	para	meta	endo
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Anopheles</i>) (★)	42.550	<u>59,6</u>	37,9 ^(a)	0,2	0,04	---	0,2	2,1	3,4	5,6	---	---
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>) (★)	42.300	<u>50,9</u>	37,1 ^(b)	0,3	0,04	---	8,9	2,8	0,7	6,6	---	---
<i>C. guilhermei</i> (★)	53.430	<u>49,1</u>	<u>49,4</u>	0,3	0,04	---	0,2	1,0	1,0	2,5	0,04	---
<i>C. luciliae</i> (★)	68.950	<u>64,6</u>	26,9	0,9	0,5	2,3	3,1	1,7	0,08	0,4	---	0,2
<i>C. ricardo</i> (★)	59.150	<u>53,5</u>	40,8 ^(a)	0,8	0,7	2,1	0,4	1,7	0,7	3,2	0,3	1,6
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (◆) (★)	29.040	<u>46,1</u>	<u>50,3</u>	0,2	---	0,1	1,6	1,7	2,3	5,1	---	0,1
<i>C. flexonema</i> (clone 7E) (★)	28.250	<u>78,0</u>	15,0	0,1	0,08	0,2	3,5	3,1	3,6	5,9	0,08	0,08
<i>C. mellifica</i> (★)	50.580	19,9	<u>75,8</u>	1,3	0,08	0,2	1,5	1,2	0,1	0,2	---	0,08
<i>C. hutneri</i> (★)	60.480	35,5	<u>59,4</u>	0,1	---	0,2	2,7	2,1	0,4	0,5	---	---
<i>Crithidia</i> sp. (Z.l.) (clone 6G) (★) (●)	65.090	36,2	<u>60,3</u>	0,2	---	1,6	0,8	0,9	0,04	0,7	---	0,4
<i>C. luciliae thermophila</i>	82.200	<u>70,0</u>	26,5 ^(a)	0,2	0,04	1,4	0,7	1,2	0,04	1,8	0,04	0,5
<i>C. hamosa</i> (★)	51.700	39,6	<u>57,2</u>	0,5	0,08	0,5	0,3	1,8	0,1	0,2	---	--
<i>C. acanthocephali</i>	131.580	<u>58,5</u>	40,4	0,1	0,08	0,04	---	0,9	0,04	0,1	---	---
<i>W. inconstans</i> (clone 4C) (★)	37.980	12,9	31,2 ^(c)	0,5	0,08	<u>53,7</u>	0,6	1,0	0,3	1,7	---	31,0
<i>W. brevicula</i> (clone 11E) (★)	25.750	5,2	27,1	1,9	0,6	<u>64,0</u>	---	1,2	0,3	3,7	0,5	52,0
<i>A. deanei</i> ("C." <i>deanei</i>) (★)	86.500	0,4	8,3 ^(c)	23,1	<u>67,4</u>	0,08	---	0,7	---	1,6	13,7	0,04
"C." <i>desouzai</i> (★)	73.660	0,8	15,5 ^(d)	20,9	<u>60,5</u>	0,3	---	2,0	---	0,4	7,0	0,2
"H." <i>roitmani</i> (clone 7E) (★)	100.000	3,9	24,6 ^(e)	15,0	<u>55,4</u>	0,4	---	0,7	---	1,1	16,7	0,4
"C." <i>oncopelti</i> (★)	25.750	1,7	<u>77,6</u> ^(c)	11,9	5,1	---	---	3,7	---	0,4	---	---

(§) isolados de insetos, com exceção de *Crithidia* sp. (C.t.) (◆) isolada de *Chamaesyce thymifolia*. (★) amostras que apresentam coanomastigotas aflageladas peculiares com cinetoplasto ante- ou paranuclear, estas isoladas, aos pares ou em grupos (haptomonas). (●) *Crithidia* sp. (Z.l.) isolada de *Zelus leucogrammus*. (★) amostras com endossimbionte.

Estágios: (pro) procoanomastigotas, (para) paracoanomastigotas, (trans) transição para metacoanomastigotas, (meta) metacoanomastigotas/opistomorfias, (endo) endocoanomastigotas (tipo 1+2), (outros) células semelhantes a um sino ou jarro. (a), (b), (c), (d) e (e), respectivamente, com 0,1%, 0,7%, 0,6%, 1,2%, e 2,1% de formas com núcleo e cinetoplasto posterior.

(*) os percentuais dos estágios sem flagelo livre estão incluídos no total de cada estágio evolutivo.

Estão destacados os percentuais dos estágios evolutivos predominantes (foram assinalados dois, quando a diferença entre eles era ≤ 5,0%).

TABELA VII

CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS OU PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *HERPETOMONAS*

O crescimento está expresso pela média do número de células/μl encontradas entre 48–144 h, em intervalos de 24 h. O padrão de diferenciação está expresso pela média dos percentuais dos estágios evolutivos determinados a cada 24 h, entre 48–144 h, após exame de pelo menos 500 células encontradas ao acaso em esfregaços corados pelo Giemsa. As amostras foram cultivadas em meio LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C).

Amostras	Células/μl	Principais estágios evolutivos							Estágios sem flagelo livre (*)			
		pro	para	trans	opisto	endo	outros	divisão	pro	para	opisto	endo
<i>H. pessoai</i> (= <i>H. samuelpessoai</i>)	57.730	<u>70,9</u>	22,6	1,7	0,7	0,08	0,6	3,4	---	---	---	---
<i>H. anglusteri</i>	40.450	<u>83,0</u>	9,8	0,7	1,5	1,9	---	3,1	---	---	---	---
<i>H. mariadeanei</i> ❶	65.850	<u>95,4</u>	2,2	---	0,4	0,1	0,8	1,1	0,04	---	0,1	0,08
<i>H. megaseliae</i>	60.080	<u>64,4</u>	30,5	1,1	1,3	---	0,1	2,6	---	---	---	---
<i>H. muscarum muscarum</i>	55.380	<u>88,1</u>	9,3	0,1	0,5	---	0,2	1,8	---	0,04	0,04	---
<i>H. muscarum ingenoplastis</i> (■) ❷	10.450	<u>94,1</u>	0,5	0,08	0,04	0,1 (◇)	---	5,2	---	---	---	0,1 (◇)
<i>H. davidi</i> (◆)	49.600	<u>85,7</u>	11,9	0,4	0,2	---	0,6	1,2	0,02	0,02	---	---
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (◆)	41.350	<u>77,3</u>	13,3	1,4	3,9	0,6	1,6	1,9	---	---	--	0,08
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (◆)	46.550	<u>96,8</u>	1,1	0,04	0,08	---	0,7	1,3	---	---	---	---
<i>Herpetomonas</i> sp. (L.s.) (●)	40.000	<u>96,6</u>	1,4	0,04	0,04	---	0,1	1,8	---	---	---	---

❶ e ❷, respectivamente, com 0,4% e 55,1% (média) de promastigotas biflageladas (com 1 núcleo e 1 cinetoplasto). (■) amostra exigiu LIT 20% SFB. (◆) isolados de plantas: *Herpetomonas* sp. (E.h.) de *Euphorbia hyssopifolia* e *Herpetomonas* sp. (S.l.) de *Solanum lycopersicum* (S.l.). (●) *Herpetomonas* sp. (L.s.) isolada de *Leptoglossus stigma*.

Estágios: (pro) promastigotas, (para) paramastigotas, (trans) transição para opistomastigotas, (opisto) opistomastigotas, (endo) endomastigotas (tipo 1, flagelo não contorna o núcleo; tipo 2, flagelo contorna o núcleo), (outros) células semelhantes a um sino, jarro ou chupeta. (◇) tipo peculiar de endomastigota (Fig. 15 B).

(*) os percentuais dos estágios sem flagelo livre estão incluídos no total de cada estágio evolutivo.

Estão destacados os percentuais dos estágios evolutivos predominantes.

TABELA VIII
CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS E
CLASSIFICADOS NO GÊNERO *LEPTOMONAS*

O crescimento está expresso pela média do número de células/ μl encontradas entre 48–144 h, em intervalos de 24 h. O padrão de diferenciação está expresso pela média dos percentuais dos estágios evolutivos determinados a cada 24 h, entre 48–144 h, após exame de pelo menos 500 células encontradas ao acaso em esfregaços corados pelo Giemsa, exceto em *L. costoris* (N= 200–500) e *L. mirabilis* (N= 100–200). As amostras foram cultivadas em meio LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C).

Amostras	Células/ μl	Estágios evolutivos							Estágios sem flagelo livre (*)			
		pro	para	trans	opisto	endo	outros	divisão	pro	para	opisto	endo
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) (IM 3943, clone) (●) ❶	35.180	<u>96,8</u>	1,1	---	---	---	---	2,1	---	---	---	---
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) (IM 3944, clone) (●) ❷	21.680	<u>98,2</u>	0,08	---	---	---	---	1,7	---	---	---	---
<i>L. pyrrocoris</i>	72.330	<u>92,2</u>	2,5	----	---	---	---	5,3	---	---	---	---
<i>L. seymouri</i>	91.650	<u>92,4</u>	5,3	---	---	---	---	2,3	---	---	---	---
<i>L. collosoma</i>	63.530	<u>90,9</u>	4,2	---	---	---	0,3	4,6	0,08	0,04	---	---
<i>L. costoris</i> ❸	5.980	<u>82,7</u>	3,4	---	---	---	---	13,9	2,8	0,7	---	---
<i>L. samueli</i>	30.000	<u>97,7</u>	0,6	---	0,08	---	---	1,6	0,1	0,08	0,08	---
<i>L. lactosovorans</i>	33.950	<u>93,5</u>	4,3	0,2	0,2	---	---	1,8	1,2	1,5	0,1	---
<i>L. mirabilis</i> ❹ (■)	1.300	<u>50,4</u>	38,2	0,3	1,2	---	---	9,9	0,9	0,3	---	---
<i>L. pulexsimulantis</i> (◆)	4.010	<u>72,6</u>	23,5	0,8	0,2	---	---	2,9	3,5	2,3	---	---
<i>L. wallacei</i> (clone B) (◆)	23.780	<u>94,7</u>	2,3	---	---	---	---	3,0	2,4	0,3	---	---
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (36/429 TD) (●) (■) (◆)	4.460	<u>95,8</u>	0,08	---	---	---	---	4,1	0,6	0,04	---	---

(●) *Leptomonas* spp. isoladas de *Lutzomyia ayrozai* (L.a.-1 e L.a.-2) e de *Oncopeltus varicolor* (O.v.). ❶, ❷, ❸ e ❹, respectivamente, com 0,8%, 0,2%, 3,4% e 1,0% de promastigotas biflageladas (com 1 núcleo e 1 cinetoplasto). (■) exigiram LIT 20% SFB. (◆) amostras cistogênicas.

Estágios: (pro) promastigotas, (para) paramastigotas, (trans) transição para opistomastigotas, (opisto) opistomastigotas, (endo) endomastigotas (tipos 1 e 2), (outros) células semelhantes a um sino ou jarro. (*) os percentuais dos estágios sem flagelo livre estão incluídos no total de cada estágio evolutivo.

Estão destacados os percentuais dos estágios evolutivos predominantes.

TABELA IX

CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *PHYTOMONAS*

O crescimento está expresso pela média do número de células/μl encontradas entre 48–144 h, em intervalos de 24 h. O padrão de diferenciação está expresso pela média dos percentuais dos estágios evolutivos determinados a cada 24 h, entre 48–144 h, após exame de pelo menos 500 células encontradas ao acaso em esfregaços corados pelo Giemsa {exceto em *Phytomonas* spp. (A.c.) e (E.c.), N= 200–350, e *P. francai*, N= 200–500}. As amostras foram cultivadas em meio LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C).

Amostras	Células/μl	Principais estágios evolutivos								Estágios sem flagelo livre (*)			
		pro	para	trans	opisto	endo	outros 1	outros 2	divisão	pro	para	opisto	outros 2
<i>P. serpens</i> (isolado 9T)	25.030	<u>97,7</u>	0,04	---	---	---	---	---	2,3	8,5	0,04	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (C.b.) (●)	28.150	<u>97,7</u>	---	---	---	---	---	---	2,3	25,4	---	---	---
<i>P. macgheeii</i> (isolado 163 M, clone A)	18.550	<u>96,2</u>	---	---	---	---	---	0,08	3,7	1,3	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (A.c.) (●)	860	<u>98,9</u>	0,06	---	---	---	---	---	1,0	52,5	0,06	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1) (●)	10.590	<u>95,9</u>	---	---	---	---	---	---	4,1	5,4	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2) (●) (■)	7.700	<u>93,4</u>	---	---	---	---	0,2	---	6,4	1,3	---	---	---
<i>P. francai</i> (■)	11.000	<u>90,6</u>	---	---	---	---	---	2,3	7,1	0,8	---	---	1,4
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) (●)	18.800	<u>92,1</u>	---	---	---	---	---	4,0	3,9	3,1	---	---	0,9

(●) *Phytomonas* spp. isoladas de *Citrus bergamia* (C.b.), *Allamanda cathartica* (A.c.), *Euphorbia pinea* (E.p.), *E. characias* (E.c.) e *Jathropha macrantha* (J.m.). (■) exigiram LIT 20% SFB.

Estágios: (pro) promastigotas, (para) paramastigotas, (trans) transição para opistomastigotas, (opisto) opistomastigotas, (endo) endomastigotas, (outros 1) células tipo sino, (outros 2) células elípticas ou arredondadas, tendo o flagelo (todo ou em parte) aparentemente aderido ao corpo, às vezes parecendo esferomastigotas. (*) os percentuais dos estágios sem flagelo livre estão incluídos no total de cada estágio evolutivo.

Estão destacados os percentuais dos estágios evolutivos predominantes.

3.3. Divisão celular em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros

As Tabelas VI–IX apresentam as médias dos percentuais do total de formas em divisão encontradas nas diferentes espécies analisadas. Estas médias variaram entre: • 0,7% (*A. deanei*) e 3,7% ("*C.*" *oncopelti*) nas amostras com a forma coanomastigota, • 1,1% (*H. mariadeanei*) e 5,2% (*H. muscarum ingenoplastis*) nas amostras classificadas como *Herpetomonas*, • 1,6% (*L. samueli*) e 13,9% (*L. costoris*) naquelas identificadas como *Leptomonas*, • 1,0% (*Phytomonas* sp. (A.c.)) e 7,1% (*P. francai*) nas espécies de *Phytomonas*. No presente trabalho, *L. mirabilis* e *L. costoris* foram as espécies que apresentaram as taxas mais altas de divisões, com médias de 9,9% e 13,9%, respectivamente. Também verificamos que percentuais altos de divisões foram geralmente observados em amostras que crescem mal nos meios utilizados, incluindo, além das que acabamos de citar, *P. francai*, *Phytomonas* sp. (E.c.) e *H. muscarum ingenoplastis* (Tabelas VII–IX). É possível que, nestas espécies, o processo de divisão seja mais lento, facilitando seu acúmulo e visualização nas culturas.

As Tabelas X–XIII apresentam as médias dos percentuais dos diferentes tipos de divisão que foram observados nas amostras analisadas entre 48–144 h de cultivo, em intervalos de 24 h. No presente estudo, estes tipos foram definidos tanto pela posição dos núcleos (no mesmo ou em diferentes planos), quanto pela posição de cada cinetoplasto em relação aos núcleos. No presente trabalho (ver item 2.6), arbitrou-se que dois tipos de divisão poderiam ser considerados predominantes quando a diferença entre seus percentuais era $\leq 10,0$.

Em diversas espécies de tripanosomatídeos, o processo de divisão celular foi também gerador de estágios evolutivos diferenciados, paralelamente ao conhecido processo de diferenciação celular, no qual ocorre a migração do cinetoplasto/flagelo em relação ao núcleo do parasita. Esta possibilidade foi observada, principalmente, no achado de divisões de metacoanomastigotas (*A. deanei*, "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*) e de endocoanomastigotas (*W. inconstans* e *W. brevicula*) em percentuais elevados (Tabela X; Figs 10, 11, setas maiores). Também foram encontradas formas em divisão com cinetoplastos e/ou núcleos em diferentes posições (Figs 5 A, C, D, 6, 7 A, 8 C, 17 A, 19 C), além de flagelos intracelulares com percursos distintos (Fig. 10 A), possibilitando a formação de diferentes estágios ao fim do processo.

No presente estudo, divisões anômalas geralmente não foram encontradas ou foram muito raras. Entretanto, tais divisões puderam ser vistas em algumas espécies: *C. flexonema* e *Phytomonas* sp. (E.p.) (0,1%), "*C.*" *oncopelti* (0,3%), *H. muscarum ingenoplastis* (0,8%) (Fig. 15 B, seta larga) e *L. costoris* (2,2%). Estas divisões podiam gerar células sem núcleo ou com dois ou mais núcleos, formas sem flagelo e/ou sem cinetoplasto (Fig. 15 B, ▷ e ►) e até mesmo pareciam

contribuir para a origem de células biflageladas, conforme exemplo visto em *H. muscarum ingenoplastis* (Fig. 15 B, seta larga). Em "*C.*" *oncopelti*, algumas divisões anômalas podiam gerar uma porção protoplasmática, que às vezes só continha os endossimbiontes (não ilustrado).

3.3.1. Divisão celular considerando a posição dos núcleos

Divisões com os núcleos em diferentes planos foram encontradas: • na maioria das espécies de *Crithidia* {*C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei*, *C. luciliae*, *C. ricardoi*, *Crithidia* sp. (C.t.), *C. flexonema*, *C. luciliae thermophila*, *C. hamosa* e *C. acanthocephali*}, • nas espécies de *Wallaceina* (Tabela X), • em todas amostras classificadas como *Herpetomonas* {*H. pessoai*, *H. anglusteri*, *H. megaseliae*, *H. muscarum*, *H. muscarum ingenoplastis*, *H. davidi*, *Herpetomonas* sp. (E.h.), *Herpetomonas* sp. (S.l.), *Herpetomonas* sp. (L.s.)} (Tabela XI), • na maioria das chamadas *Leptomonas* {*Leptomonas* spp. (L.a.-1) e (L.a.-2), *L. pyrrocoris*, *L. seymouri*, *L. costoris*, *L. samueli*, *L. mirabilis*, *L. pulexsimulantis*, *L. wallacei*, e *Leptomonas* sp. (O.v.)} (Tabela XII), mas em apenas uma amostra de {*Phytomonas* sp. (E.c.)} (Tabelas XIII). As Figs 5 A, B, D, 6, 7 A, 8 C, 10 A, 11 B, 13 B, 14 A, 17 A (indicadas por setas maiores e •) ilustram este tipo de divisão, evidenciando seu potencial para gerar estágios distintos.

O predomínio de divisões com núcleos no mesmo planos, foi evidente em "*C.*" *oncopelti*, *Phytomonas* sp. (C.b.) e *P. francai* (Tabelas X, XIII). Nas demais amostras predominaram dois tipos de divisões, com núcleos no mesmo ou em diferentes planos, como em *C. mellificae*, *Crithidia* sp. (Z.l.), *A. deanei*, "*C.*" *desouzai*, *L. collosoma*, *L. lactosovorans*, *P. serpens*, *P. macgheeii*, *Phytomonas* sp. (A.c) e *Phytomonas* sp. (J.m.) (Tabelas X, XII, XIII).

3.3.2. Divisão celular considerando a posição dos cinetoplastos e o curso intracelular do flagelo

A posição predominante dos cinetoplastos nas células em divisão nos tripanosomatídeos com a forma coanomastigota variou muito. Apenas em *C. flexonema* ocorria divisão somente com os cinetoplastos antenucleares (procoanomastigotas) (Tabela X; Fig. 7 A, setas maiores). Os cinetoplastos ocorreram principalmente em posição paranuclear em *C. mellificae*, *C. hutneri*, *Crithidia* sp. (Z.l.), *C. luciliae thermophila*, *C. hamosa*, *C. acanthocephali*, *W. incontans* e "*C.*" *oncopelti* (Tabela X; e.g. Figs 9, setas maiores). Já em *A. deanei*, "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*, a divisão ocorria principalmente com os cinetoplastos posnucleares (Fig. 11, setas maiores). Em *C. fasciculata* (cepa *Anopheles*), *C. ricardoi* e *Crithidia* sp. (C.t.), predominou um tipo de divisão em que um dos cinetoplastos era antenuclear e o outro paranuclear (Tabela X).

Nas demais espécies com coanomastigotas predominaram dois tipos de divisão. Em *W. brevicula*, ocorreram percentuais semelhantes de células em divisão no estágio de

paracoanomastigota e de endocoanomastigota (Fig. 10, setas maiores). Em *C. fasciculata* (cepa *Culex*), *C. guilhermei* e *C. luciliae* ocorreram percentuais semelhantes de divisões com cinetoplastos paranucleares, como também divisões com os cinetoplastos em diferentes posições, um deles sendo antenuclear e o outro paranuclear (Tabela X; e.g. Figs 5 B, setas maiores).

Na maioria das espécies classificadas como *Herpetomonas* e *Leptomonas* (*H. anglusteri*, *H. mariadeanei*, *H. megaseliae*, *H. muscarum muscarum*, *H. m. ingenoplastis*, *H. davidi*, *Herpetomonas* sp. (E.h.), *Herpetomonas* sp. (S.l.), *Herpetomonas* sp. (L.s.), *Leptomonas* sp. (L.a.-2), *L. pyrrhocris*, *L. collosoma*, *L. costoris*, *L. samueli*, *L. lactosovorans*, *L. mirabilis*, *L. pulexsimulantis*, *L. wallacei* e *Leptomonas* sp (O.v.)), o processo de divisão ocorria predominantemente com os cinetoplastos em posição antenuclear, ou seja em promastigotas (Tabelas XI, XII; Figs 14 B–D, 15–21, setas maiores). Em todas as espécies de *Phytomonas* só foram encontradas em divisões com cinetoplasto antenuclear (Tabela XIII; Figs 22–24, setas).

Nas amostras classificadas como *Herpetomonas* ou *Leptomonas*, o predomínio de dois tipos de divisão (com relação à posição dos cinetoplastos) ocorreu em poucas espécies. Em *H. pessoai* e *Leptomonas* sp. (L.a.-1) predominavam as divisões tanto com ambos cinetoplastos antenucleares, quanto com um deles sendo antenuclear e o outro paranuclear (Tabelas XI, XII; Figs 14 A, 17 A, setas). Em *L. seymouri*, predominaram tanto as divisões com os cinetoplastos antenucleares, quanto aquelas com os cinetoplastos paranucleares (Tabela XII). Por outro lado, em *L. pulexsimulantes*, embora predominassem as divisões com cinetoplastos antenucleares (Fig. 20, setas maiores), também ocorreram outros três tipos, inclusive dois deles em taxas > 24,0% (Tabela XII).

TABELA X

DIVISÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS QUE APRESENTAM A FORMA COANOMASTIGOTA (§) E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Os dados indicam os percentuais de tipos divisão em esfregaços corados pelo Giemsa de culturas em LIT básico (~27,3°C) observados em intervalos de 24 h, entre 48–144 h. Foram examinadas pelo menos 50 células em processo de divisão encontradas ao acaso, nelas determinando-se a posição dos núcleos e dos cinetoplastos em relação a estes, além de tipos peculiares.

Amostras	Posição dos núcleos		Posição dos cinetoplastos (§)					endo
	mesmo plano	diferentes planos	ante	para	Pos	ante/para	outros	
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Anopheles</i>)	16,5	83,5	36,5	9,4	---	51,8	2,3	---
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>)	40,0	60,0	20,0	34,0	---	44,0	2,0	---
<i>C. guilhermei</i>	21,9	78,1	21,8	43,7	---	34,5	---	---
<i>C. luciliae</i>	36,2	63,8	15,0	37,0	---	45,7	2,3	---
<i>C. ricardo</i>	30,7	69,3	3,9	30,7	---	62,7	2,7	---
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (♦)	13,0	87,0	27,5	15,9	---	55,1	1,5	---
<i>C. flexonema</i> (clone 7E)	16,7	83,3	65,6	8,9	---	23,3	2,2	---
<i>C. mellificae</i>	46,7	53,3	10,6	58,7	---	30,7	---	---
<i>C. hutneri</i>	55,9	44,1	19,3	51,7	---	29,0	---	---
<i>Crithidia</i> sp. (Z.l.) (clone 6G) (●)	47,4	52,6	12,9	53,8	---	33,3	---	---
<i>C. luciliae thermophila</i>	27,7	72,3	13,3	50,6	---	36,1	---	---
<i>C. harmosa</i>	40,0	60,0	6,7	73,3	---	20,0	---	---
<i>C. acanthocephali</i>	20,0	80,0	2,7	57,3	---	40,0	---	---
<i>W. incontans</i> (clone 4C)	33,3	66,7	1,4	49,3	---	16,0	---	33,3
<i>W. brevicula</i> (clone 11E)	30,4	69,6	5,0	38,0	2,5	8,9	3,8	41,8
<i>A. deanei</i> (= "C." <i>deanei</i>) (★)	46,9	53,1	---	4,5	77,3	---	18,2	---
"C." <i>desouzai</i> (★)	52,8	47,2	---	11,8	56,7	2,4	29,1	---
"H." <i>roitmani</i> (clone 7E) (★)	55,5	44,5	3,0	20,2	57,6	2,0	17,2	---
"C." <i>oncopelti</i> (★)	66,4	33,6	3,8	76,9	11,6	1,9	5,8	---

(§) isolados de insetos, com exceção de *Crithidia* sp. (C.t.) (♦) isolada de *Chamaesyce thymifolia*. (●) *Crithidia* sp. (Z.l.) isolada de *Zelus leucogrammus*. (★) amostras com endossimbionte.

(§) posição dos cinetoplastos em relação aos núcleos: (ante) anteriores, (para) paranucleares, (pos) posteriores, (ante/para) um anterior e o outro paranuclear, (outros) um anterior ou paranuclear e o outro posterior.

(endo) divisão no estágio de endocoanomastigota.

Estão destacados os percentuais mais elevados (foram marcados dois, quando a diferença entre eles era ≤ 10,0%).

TABELA XI

**DIVISÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS
OU PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *HERPETOMONAS***

Os dados indicam os percentuais de tipos divisão em esfregaços corados pelo Giemsa de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C) observados em intervalos de 24 h, entre 48–144 h. Foram examinadas pelo menos 50 células em processo de divisão encontradas ao acaso, nelas determinando-se a posição dos núcleos e dos cinetoplastos em relação a estes.

Amostras	Posição dos núcleos		Posição dos cinetoplastos (‡)				
	mesmo plano	diferentes planos	ante	Para	pos	ante/para	outros
<i>H. pessoai</i> (= <i>H. samuelpeessoai</i>)	21,0	<u>79,0</u>	<u>50,0</u>	5,0	---	<u>40,0</u>	5,0
<i>H. anglusteri</i>	14,3	<u>85,7</u>	<u>82,2</u>	1,2	---	16,6	---
<i>H. mariadeanei</i>	31,5	<u>68,5</u>	<u>96,4</u>	1,8	---	1,8	---
<i>H. megaseliae</i>	35,8	<u>64,2</u>	<u>67,2</u>	10,4	---	22,4	---
<i>H. muscarum muscarum</i>	42,1	<u>57,9</u>	<u>68,1</u>	7,3	---	24,6	---
<i>H. muscarum ingenoplastis</i> (■)	19,8	<u>80,2</u>	<u>99,0</u>	1,0	---	---	---
<i>H. davidi</i> (◆)	23,7	<u>76,3</u>	<u>68,5</u>	3,9	---	27,6	---
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (◆)	10,0	<u>90,0</u>	<u>58,0</u>	6,0	---	34,0	2,0
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (◆)	33,8	<u>66,2</u>	<u>90,3</u>	3,2	---	6,5	---
<i>Herpetomonas</i> sp. (L.s.) (●)	30,6	<u>69,4</u>	<u>87,8</u>	1,0	---	11,2	---

(■) exigiu LIT 20% SFB. (◆) isolados de plantas: além de *H. davidi*, *Herpetomonas* spp. isoladas de *Euphorbia hyssopifolia* (E.h.) e de *Solanum lycopersicum* (S.l.). (●) *Herpetomonas* sp. (L.s.) isolada de *Leptoglossus stigma*.

(‡) **posição dos cinetoplastos em relação aos núcleos:** (**ante**) anteriores, (**para**) paranucleares, (**pos**) posteriores, (**ante/para**) um anterior e o outro paranuclear, (**outros**) um anterior ou paranuclear e o outro posterior.

Estão destacados os percentuais mais elevados (foram marcados dois, quando a diferença entre eles era ≤ 10,0%).

TABELA XII

**DIVISÃO CELULAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE
INSETOS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *LEPTOMONAS***

Os dados indicam os percentuais de tipos divisão em esfregaços corados pelo Giemsa de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C) observados em intervalos de 24 h, entre 48–144 h. Foram examinadas pelo menos 50 células em processo de divisão encontradas ao acaso, nelas determinando-se a posição dos núcleos e dos cinetoplastos em relação a estes.

Amostras	Posição dos núcleos		Posição dos cinetoplastos (‡)			
	mesmo plano	diferentes planos	ante	para	pos	ante/para
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) (IM 3943, clone) (●)	10,8	<u>89,2</u>	<u>44,6</u>	6,2	---	<u>49,2</u>
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) (IM 3944, clone) (●)	31,1	<u>68,9</u>	<u>93,3</u>	1,3	---	5,4
<i>L. pyrrocoris</i>	20,6	<u>79,4</u>	<u>52,9</u>	26,4	---	20,7
<i>L. seymouri</i>	39,5	<u>60,5</u>	<u>45,0</u>	<u>38,1</u>	---	16,9
<i>L. collosoma</i>	<u>51,8</u>	<u>48,2</u>	<u>91,7</u>	1,0	---	7,3
<i>L. costoris</i>	12,9	<u>87,1</u>	<u>78,1</u>	2,7	---	19,2
<i>L. samueli</i>	20,3	<u>79,7</u>	<u>71,2</u>	1,7	---	27,1
<i>L. lactosovorans</i>	<u>52,9</u>	<u>47,1</u>	<u>98,0</u>	---	---	2,0
<i>L. mirabilis</i> (■)	7,5	<u>92,5</u>	<u>62,3</u>	---	---	37,7
<i>L. pulexsimulantis</i> (◆)	40,5	<u>59,5</u>	<u>43,3</u>	24,3	1,3	31,1
<i>L. wallacei</i> (clone B) (◆)	6,9	<u>93,1</u>	<u>61,1</u>	---	---	38,9
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (36/429 TD) (●) (■)(◆)	7,4	<u>92,6</u>	<u>74,7</u>	---	---	25,3

(●) *Leptomonas* spp. isoladas de *Lutzomyia ayrozai* (L.a.-1 e L.a.-2) e de *Oncopeltus varicolor* (O.v.). (■) exigiram LIT 20% SFB. (◆) amostras cigotênicas.

(‡) posição dos cinetoplastos em relação aos núcleos: (ante) anteriores, (para) paranucleares, (pos) posteriores, (ante/para) um anterior e o outro paranuclear.

Estão destacados os percentuais mais elevados (foram marcados dois, quando a diferença entre eles era ≤ 10,0%).

TABELA XIII

DIVISÃO CELULAR EM TRIPANOSMATÍDEOS ISOLADOS DE PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *PHYTOMONAS*

Os dados indicam os percentuais de tipos divisão em esfregaços corados pelo Giemsa de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C) observados em intervalos de 24 h, entre 48–144 h. Foram examinadas pelo menos 50 células {exceto em *Phytomonas* sp. (A.c.), N= 28} em processo de divisão encontradas ao acaso, nelas determinando-se a posição dos núcleos e dos cinetoplastos em relação a estes.

Amostras	Posição dos núcleos		Posição dos cinetoplastos (‡)			
	mesmo plano	diferentes planos	pro	para	ante/para	outros
<i>P. serpens</i> (isolado 9T)	<u>53,4</u>	<u>46,6</u>	<u>100</u>	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (C.b.) (●)	<u>55,9</u>	44,1	<u>100</u>	---	---	---
<i>P. macgheeii</i> (isolado 163 M, clone A)	<u>47,5</u>	<u>52,5</u>	<u>100</u>	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (A.c.) (●)	<u>46,4</u>	<u>53,6</u>	<u>100</u>	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1) (●)	<u>56,3</u>	43,7	<u>100</u>	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2) (●) (■)	17,1	<u>82,9</u>	<u>100</u>	---	---	---
<i>P. francai</i> (■)	<u>64,1</u>	35,9	<u>100</u>	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) (●)	<u>51,3</u>	<u>48,7</u>	<u>100</u>	---	---	---

(●) *Phytomonas* spp. isoladas de *Citrus bergamia* (C.b.), *Allamanda cathartica* (A.c.), *Euphorbia pinea* (E.p.), *Euphorbia characias* (E.c.) e *Jathropha macrantha* (J.m.). (■) exigiram LIT 20% SFB.

(‡) **posição dos cinetoplastos em relação aos núcleos:** (ante) anteriores, (para) paranucleares, (pos) posteriores, (ante/para) um anterior e o outro paranuclear, (outros) um anterior ou paranuclear e o outro posterior.

Estão destacados os percentuais mais elevados (foram marcados dois, quando a diferença entre eles era ≤ 10,0%).

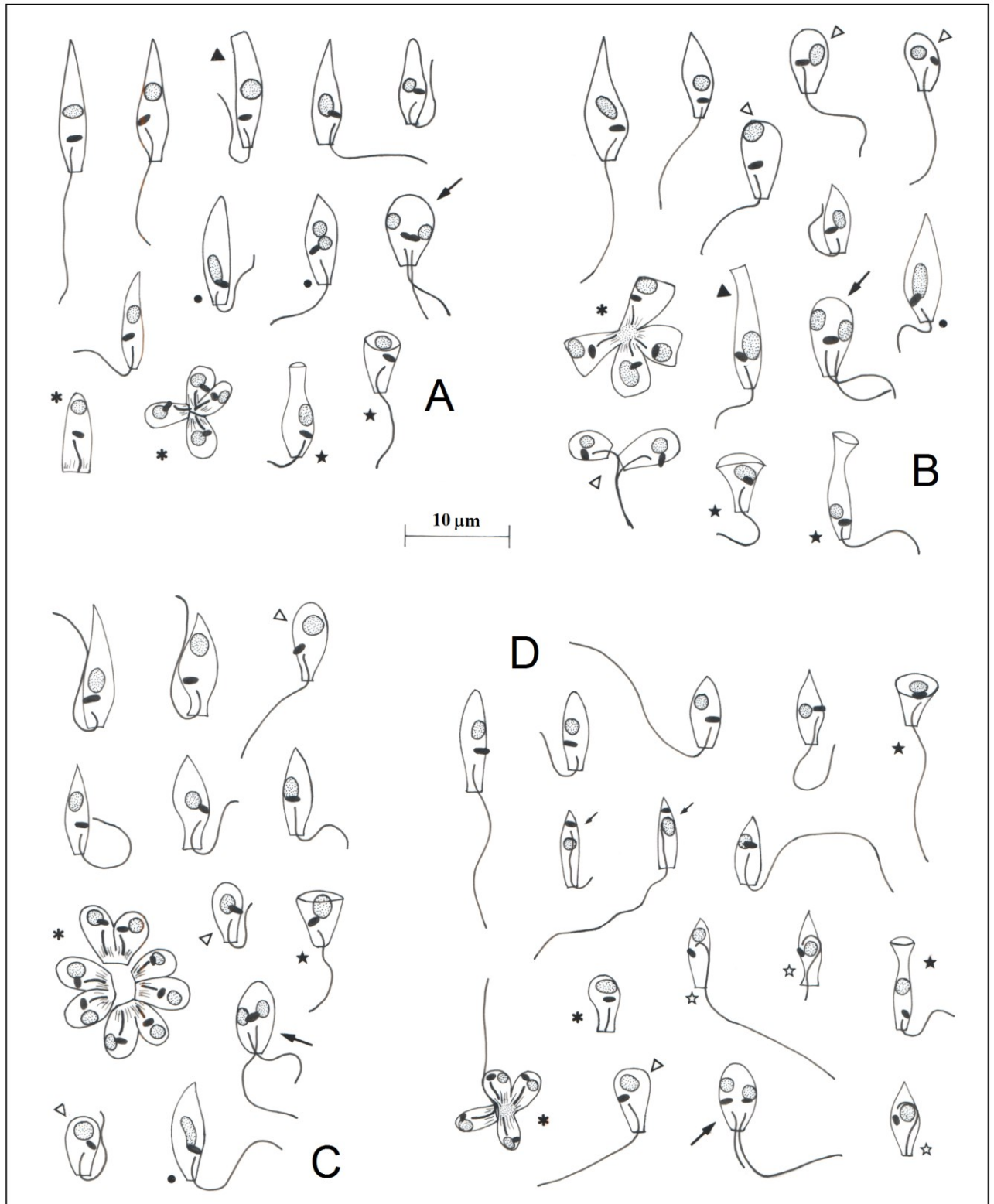


Figura 5: Estágios evolutivos encontrados em *Crithidia fasciculata* (cepa *Anopheles*) (A), *C. fasciculata* (cepa *Culex*) (B), *C. guilhermei* (C) e *C. luciliae* (D). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas sem flagelo livre, isoladas ou em grupos de 2 ou mais (haptomonas) (*), os estágios com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**) (☆), as células com flagelo curvado intracelularmente (☆), as formas semelhantes a um sino ou jarra (★), as células flageladas com núcleo na extremidade posterior (ou próximo), a qual é arredondada (►) e as formas com a extremidade posterior reta (▶). Observe também os estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**) (♣) e as células cujo núcleo é alongado na direção do cinetoplasto, sugerindo um início de divisão (●). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (~27,3°C). Todos os desenhos estão na mesma escala.

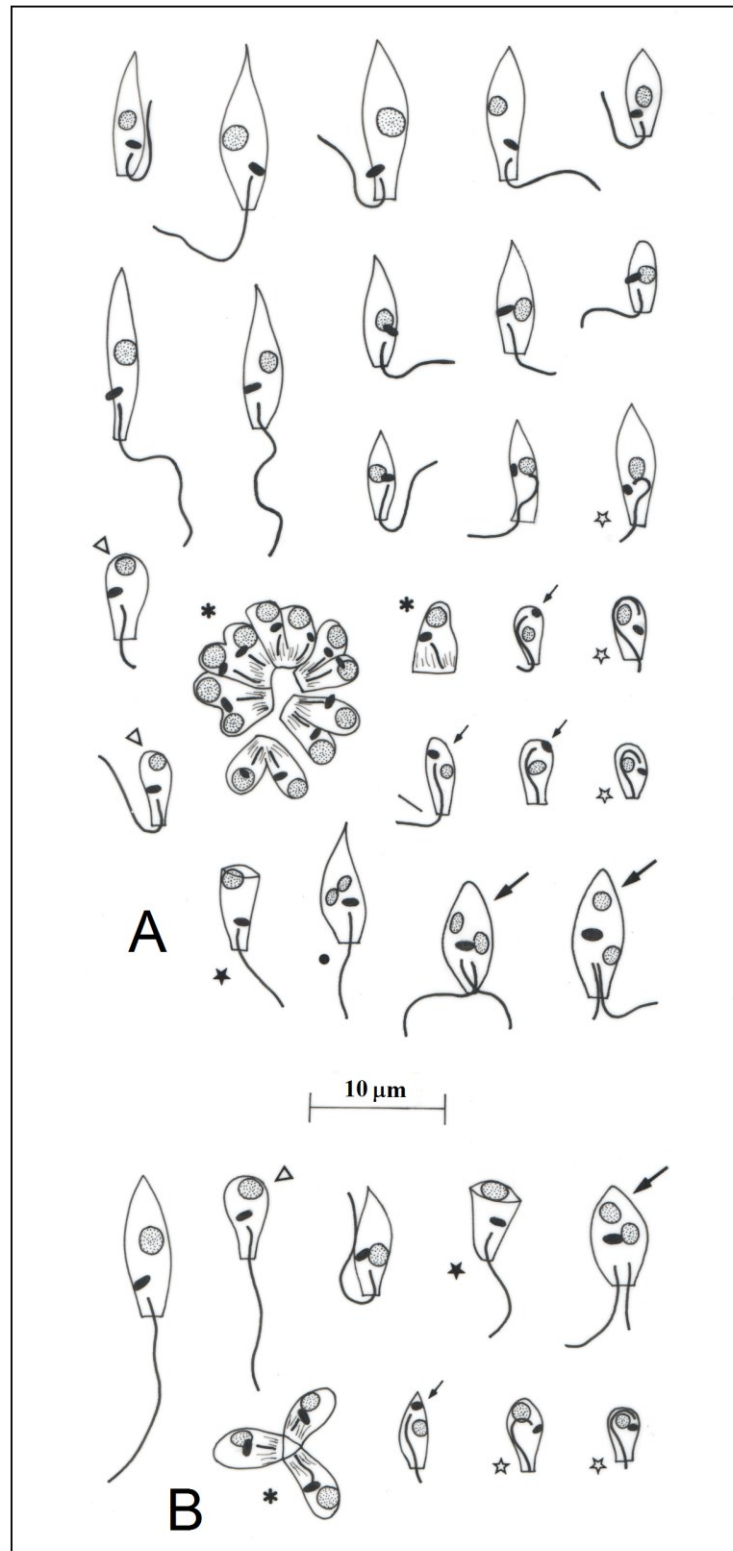


Figura 6: Estágios evolutivos encontrados em *Crithidia ricardoï*: amostra original (A) e clone 1A (B). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- e paranuclear, as formas peculiares sem flagelo livre, isoladas ou em grupos de 2 ou mais (haptomonas) (*), as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆), as células semelhantes a um sino (★) e as formas em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Observe as células flageladas com núcleo na extremidade posterior, a qual é arredondada (▷), além do estágio em início de divisão (•). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquela indicada por uma **barra fina** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

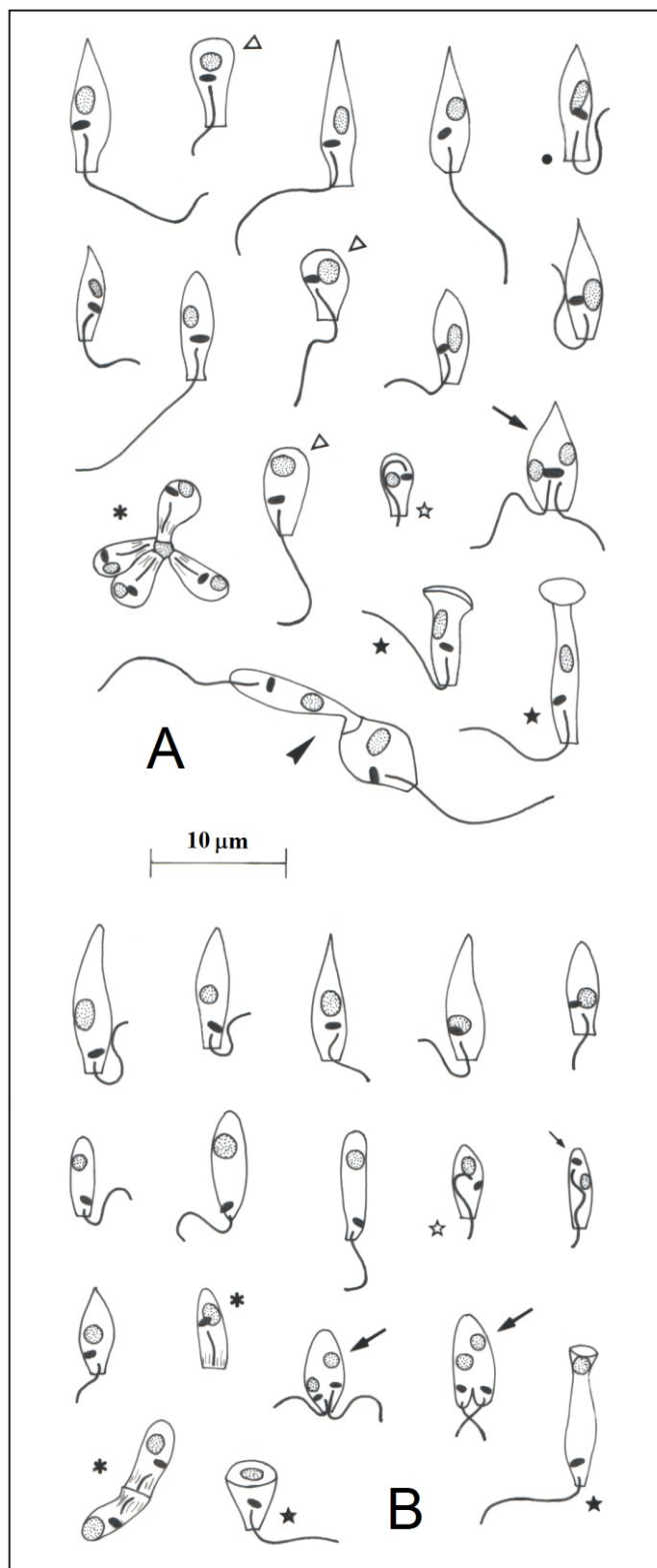


Figura 7: Estágios evolutivos encontrados em *Crithidia* sp. (C.t.) (amostra original) isolada de *Chamaesyce thymifolia* (Euphorbiaceae) (A) e *Crithidia flexonema* (clone 7E) (B). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- e paranuclear, as formas sem flagelo livre, isoladas ou em grupos de 2 ou mais (haptomonas) (*), a forma com cinetoplasto posnuclear (seta menor), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆) e as células semelhantes a um sino ou jarra (★). Observe os estágios em divisão binária longitudinal (setas maiores) e a célula cujo núcleo é alongado na direção do cinetoplasto, sugerindo um início de divisão (●). Observe também as formas flageladas com núcleo próximo à extremidade posterior, a qual é arredondada (▷) e o par de células apostas na Fig. A (cabeça de seta). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas pela seta menor e estrelas vazias (144 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

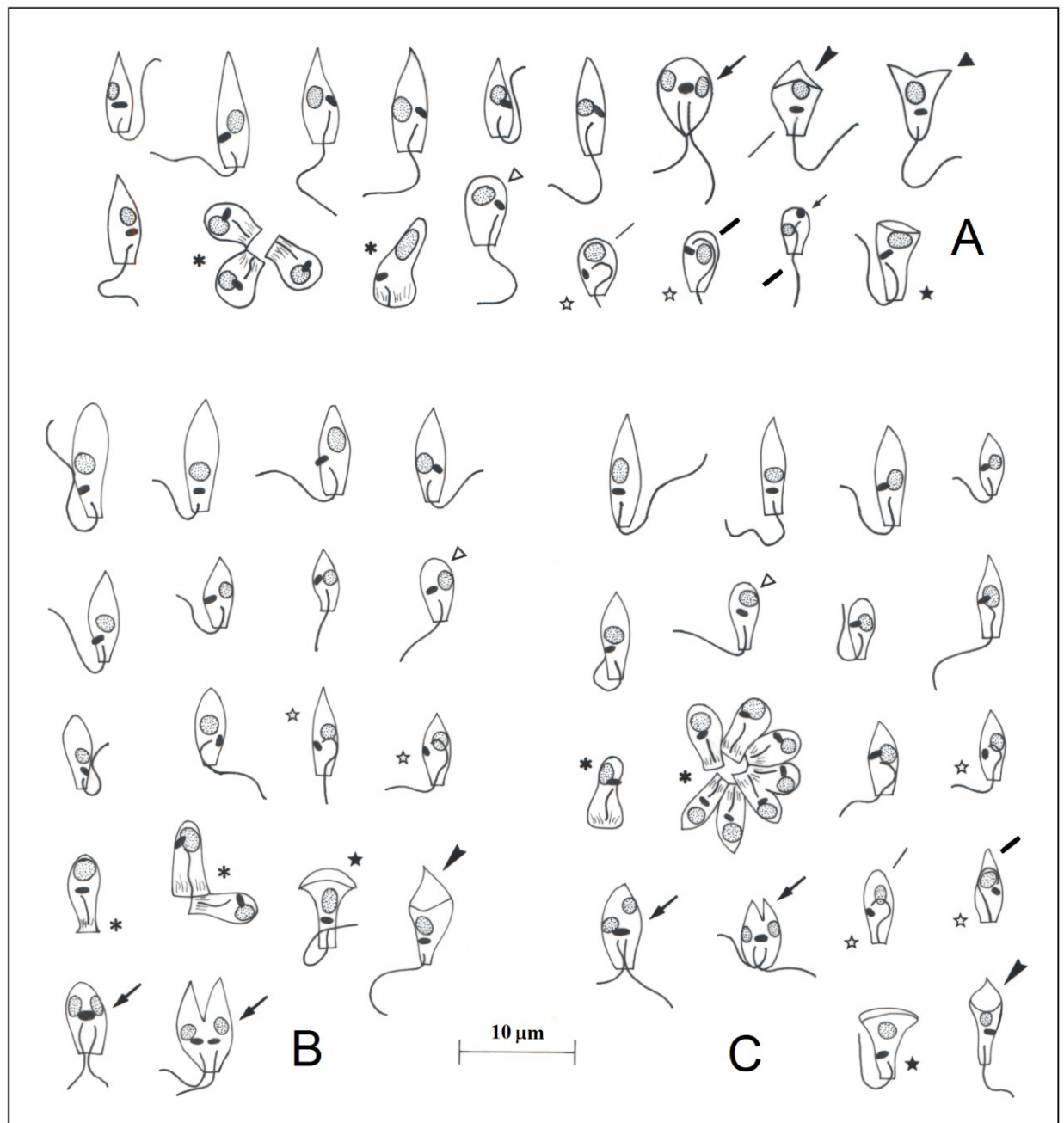


Figura 8: Estágios evolutivos encontrados em *Crithidia mellificae* (A), *C. hutneri* (B) e *Crithidia* sp. (Z.I.) (clone 6G) isolada de *Zelus leucogrammus* (C). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas sem flagelo livre, isoladas ou em grupos de 2 ou mais (haptomonas) (*), o estágio com cinetoplasto posnuclear (**seta menor**), as formas com flagelo curvado intracelularmente (☆) e as células semelhantes a um sino (★). Observe também as células flageladas com núcleo próximo à extremidade posterior, a qual é arredondada (▷), as formas cuja extremidade posterior tem aspecto prismático (**cabeça de seta**) ou uma reentrância peculiar (▶), além dos estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina menor** (96 h), **barra fina maior** (120 h) e uma **barra larga** (144 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

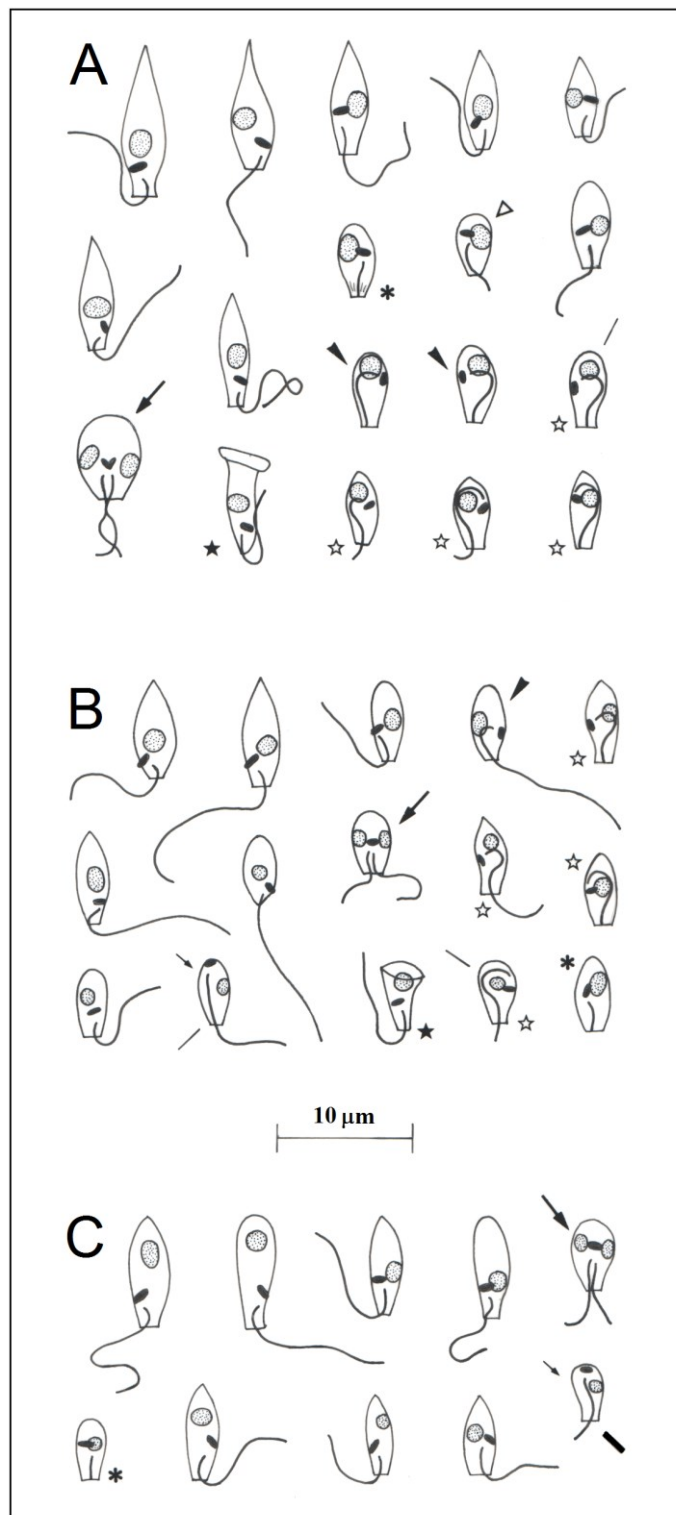


Figura 9: Estágios evolutivos encontrados em *Crithidia luciliae thermophila* (A), *C. hamosa* (B) e *C. acanthocephali* (C). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- e paranuclear, as formas sem flagelo livre isoladas (*), as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆) e as formas em transição para estes (**cabeças de seta**). Observe também as células flageladas com cinetoplasto paranuclear e núcleo na extremidade posterior, a qual é arredondada (▷), as formas semelhantes a um sino (★) e os estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina** (96 h) e uma **barra larga** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

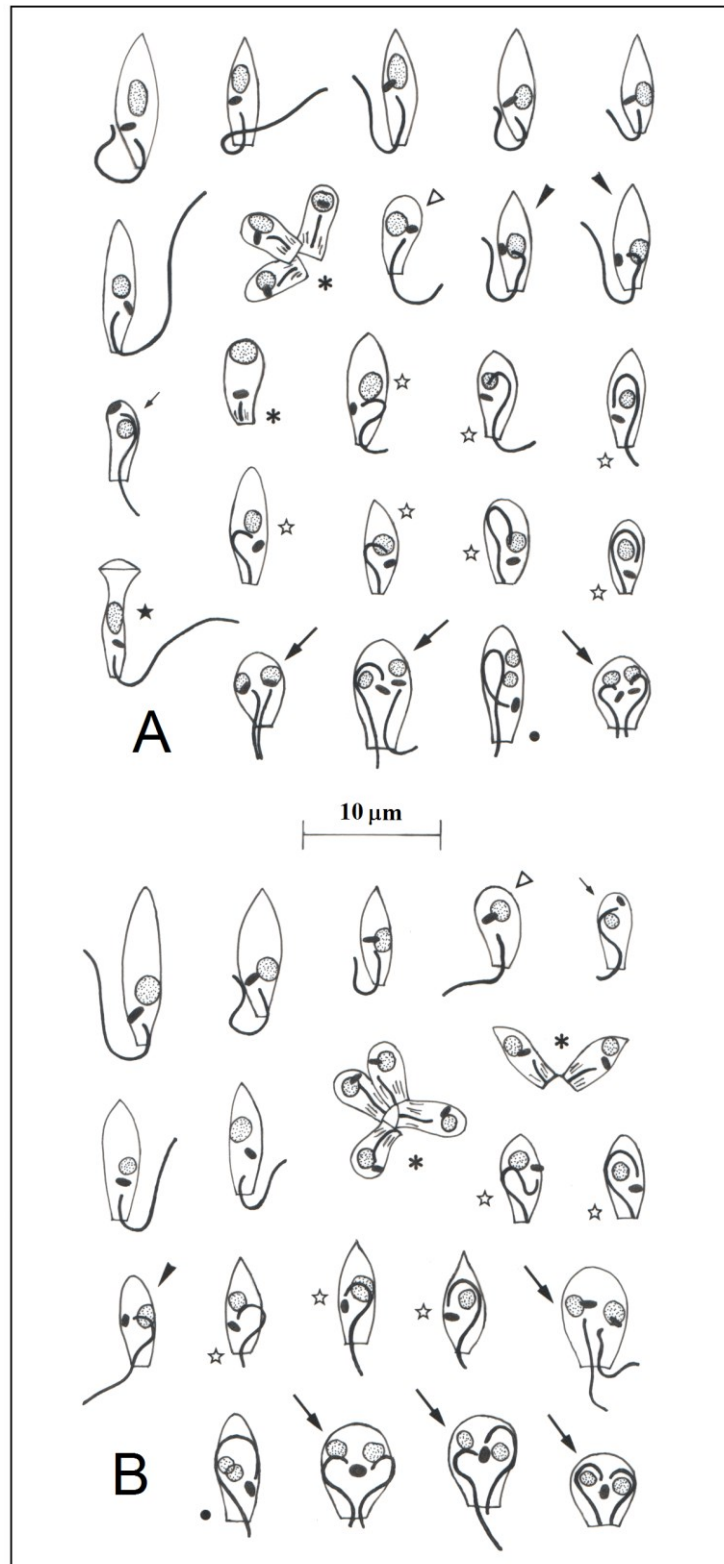


Figura 10: Estágios evolutivos encontrados em *Wallaceina inconstans* (clone 4C) (A) e *W. brevicula* (clone 11E) (= *Proteomonas*) (B). Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas sem flagelo livre, isoladas ou em grupos de 2 ou mais (haptomonas) (*), as células com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆) e as formas em transição para estes (**cabeças de seta**). Observe as diferentes formas em divisão binária (**setas maiores**), em particular aquelas com os flagelos curvados intracelularmente, além das endocoanomastigotas com dois núcleos, sugerindo o início de uma divisão (●). Note as células flageladas com cinetoplasto paranuclear e núcleo próximo à extremidade posterior, a qual é arredondada (▷), além da célula semelhante a uma jarra (★) na Fig. A. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas pelas **setas menores** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

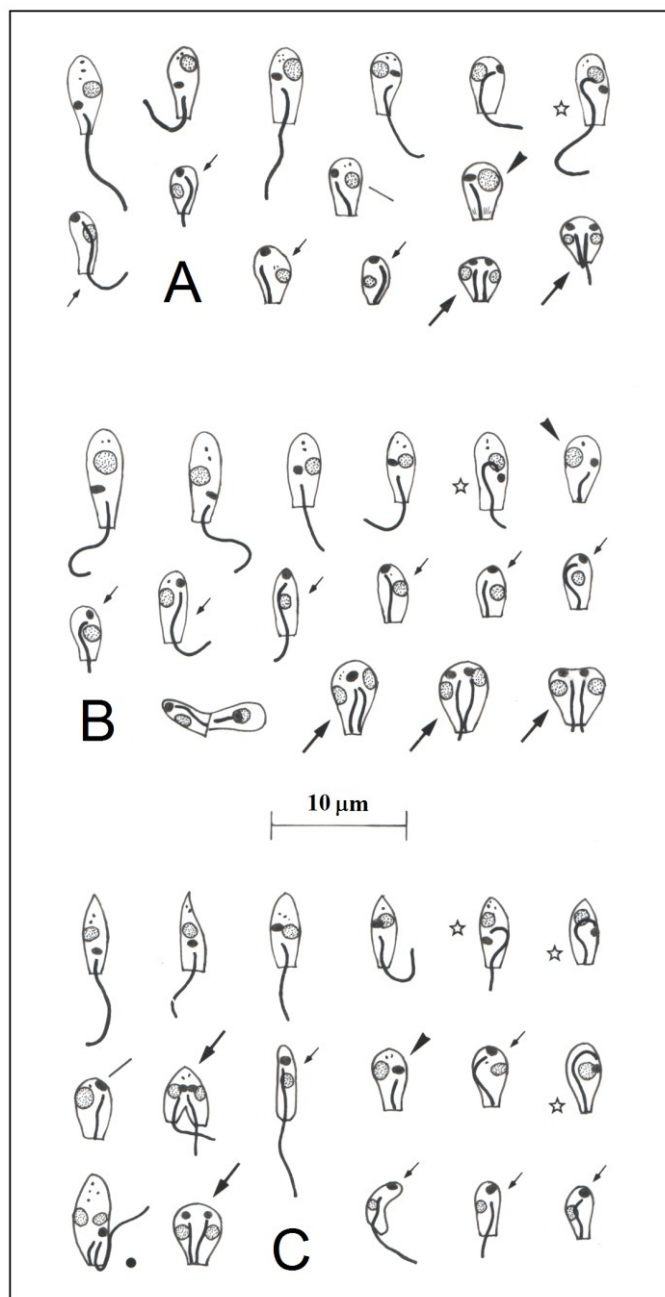


Figura 11: Estágios evolutivos encontrados em *Angomonas deanei* (= *A. deanei*) (A), "*Crithidia*" *desouzai* (B) e "*Herpetomonas*" *roitmani* (C) (amostras com endossimbionte), todas do gênero *Angomonas*. Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, os estágios com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**) e as formas com cinetoplasto em transição para a posição posterior (**barras finas**). Observe também as células com flagelo curvado intracelularmente (☆) e as formas sem flagelo livre com cinetoplasto paranuclear (**cabeças de seta**). Note os estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**), em particular aqueles com os cinetoplastos posnucleares; observe também uma célula em fase mais inicial de divisão (•). Na Fig. B, note o par de células aflageladas aderidas pelas extremidades anteriores, uma com cinetoplasto paranuclear e a outra posnuclear. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas pelas **estrelas vazias** na Fig. A (120 h) e na Fig. B (144 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

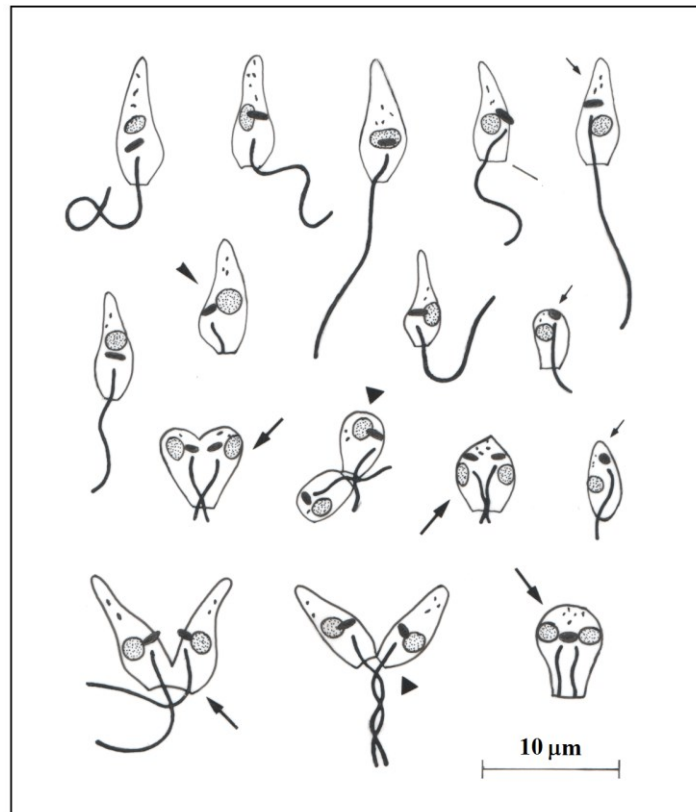


Figura 12: Estágios evolutivos encontrados em "*Crithidia*" *oncopelti* (amostra com endossimbionte), gênero *Strigomonas*. Note, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paraxial, o estágio sem flagelo livre com cinetoplasto paraxial (**cabeça de seta**), as células com cinetoplasto posaxial (**setas menores**) e a forma com o cinetoplasto em transição (**barra fina**). Observe os estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**), incluindo aqueles em que a separação celular parece iniciar-se pela extremidade posterior. Note também os pares de células unidas pelas extremidades anteriores e os flagelos (**▶**), estas aparentemente ao final de uma divisão. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (~27,3°C). Todos os desenhos estão na mesma escala.

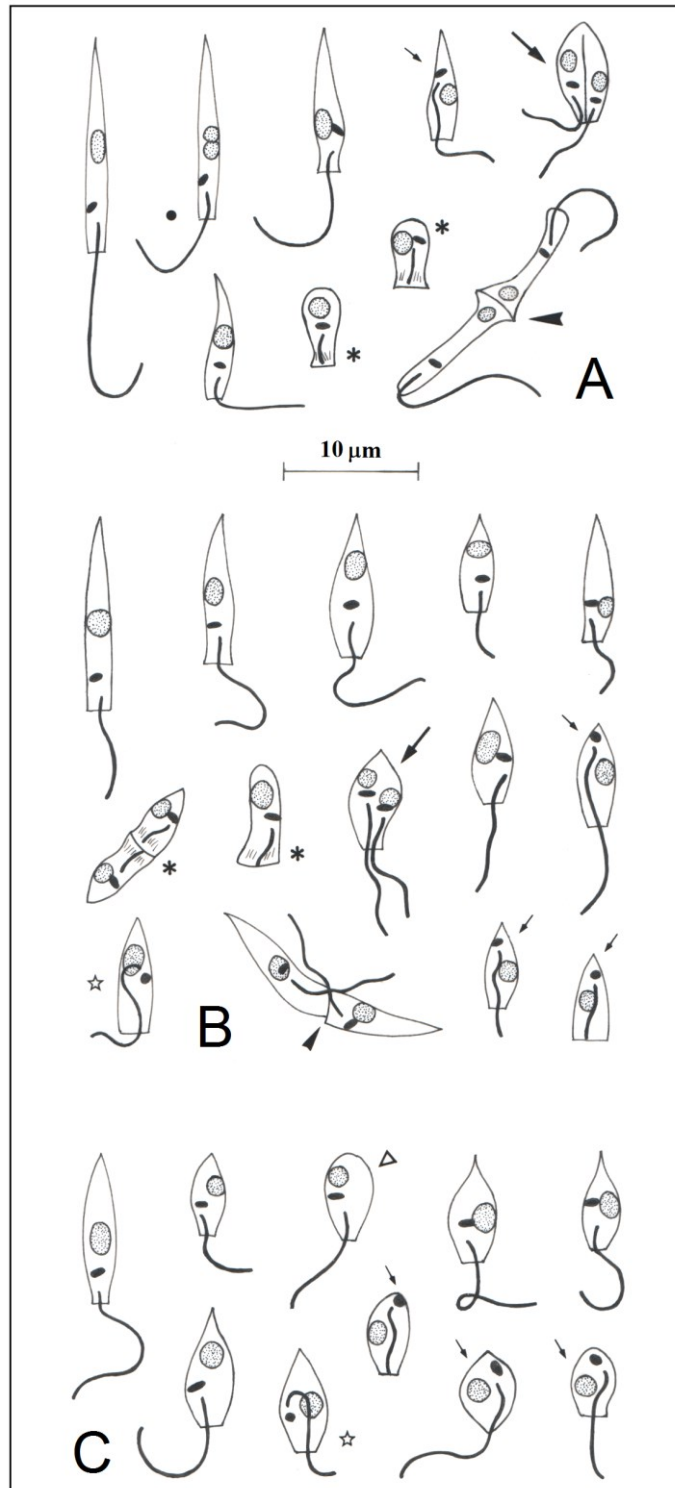


Figura 13: Estágios evolutivos encontrados em "*Herpetomonas*" *dedonderi* (amostra original). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 48 h (A), 72 h (B) e 120 h (C). Note a variabilidade na relação comprimento/largura do corpo celular nas diferentes horas de cultivo. Observe, além das células flageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas sem flagelo livre, isoladas ou unidas (haptomonas) (*), as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**) e os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆). Observe os estágios em divisão binária longitudinal típica (**setas maiores**) e a célula binucleada na Fig. A (•) sugerindo o início do processo de divisão pelo núcleo; note também as formas flageladas aderidas pelas extremidades anteriores na Fig. B (**cabeça de seta menor**). Na Fig. A, observe também o par peculiar de células apostas (**cabeça de seta maior**) e, na Fig. C, a célula flagelada com núcleo próximo à extremidade posterior, a qual é arredondada (▷). Todos os desenhos estão na mesma escala.

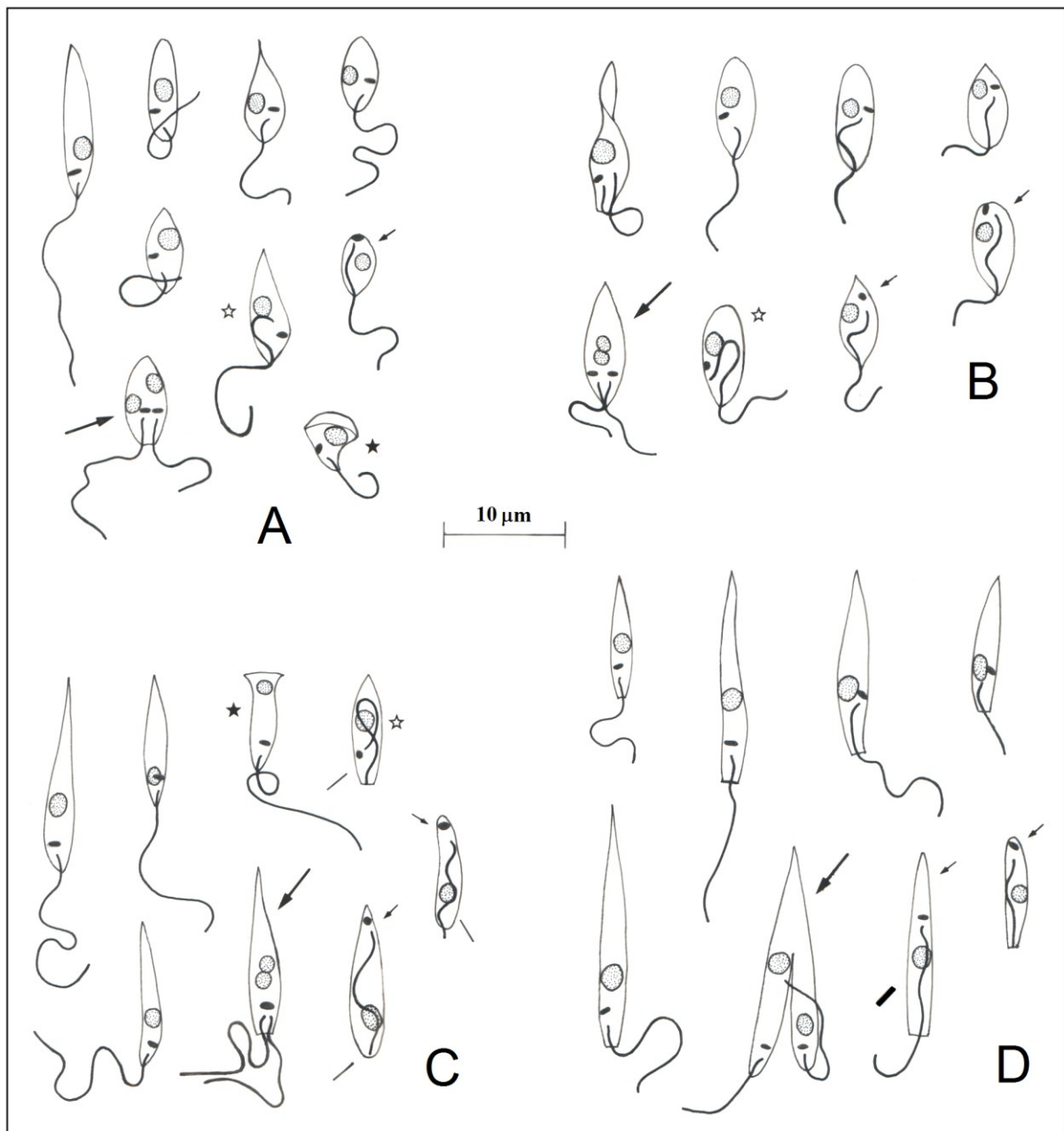


Figura 14: Estágios evolutivos encontrados em *Herpetomonas pessoai* (= *H. samuelpeessoai*) (A), *H. angusteri* (B), *H. mariadeanei* (C) e *H. megaseliae* (D). Note, além dos estágios flagelados com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (☆), as células semelhantes a um sino (★) e as formas em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra larga** (96 h) e uma **barra fina** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

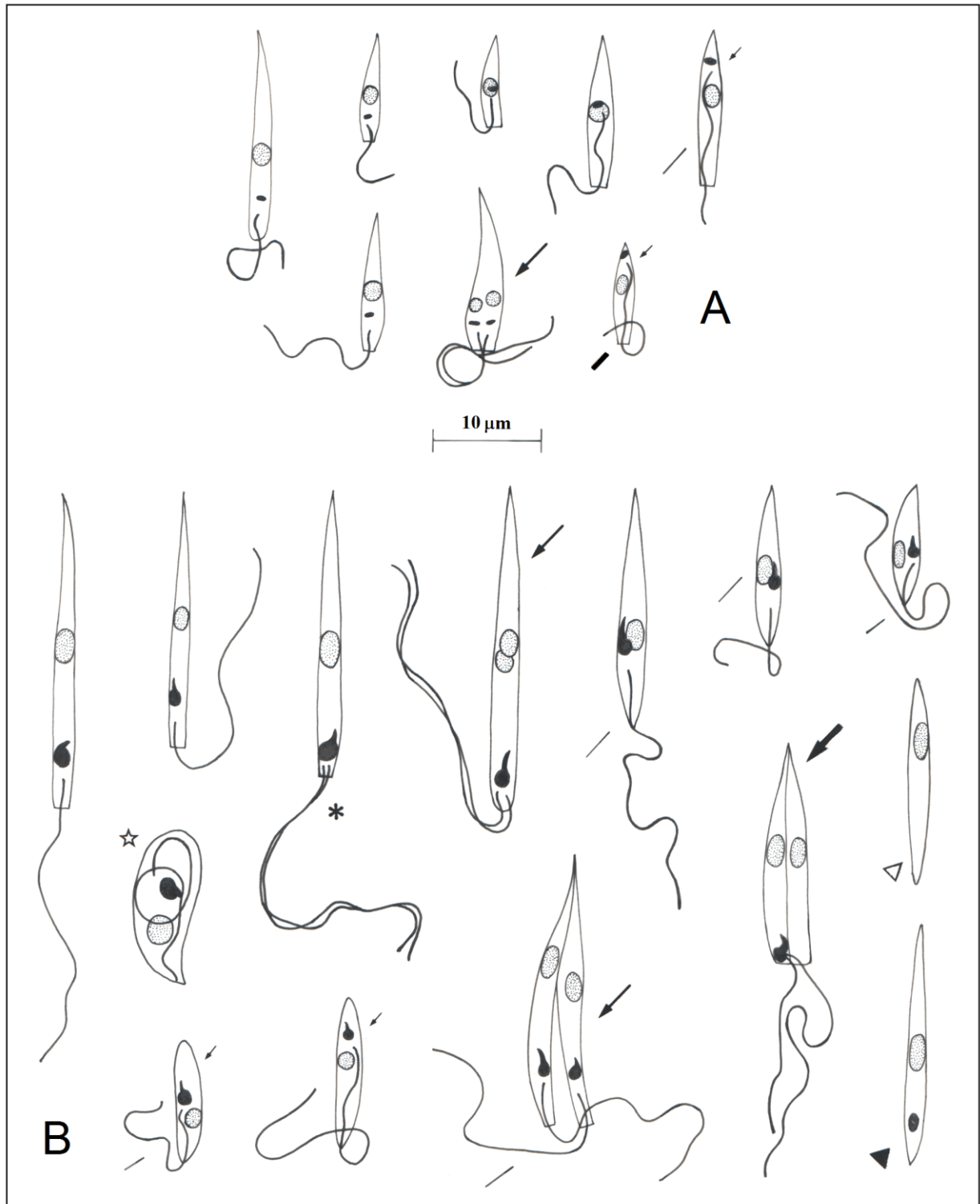


Figura 15: Estágios evolutivos encontrados em *Herpetomonas muscarum muscarum* (A) e *H. muscarum ingenoplastis* (B). Note a acentuada diferença de tamanho entres estas "subespécies" e a forma peculiar do cinetoplasto da última. Observe, além das promastigotas e paramastigotas, as opisthomonads (**setas finas menores**) e as formas em divisão binária típica (**setas finas maiores**). Na Fig. B, note a promastigota com 1 núcleo e biflagelada (*), a forma peculiar com flagelo embutido (☆), um tipo anômalo de divisão (**seta larga**) que parece ser a origem de pelo menos algumas células biflageladas e de formas sem flagelo e cinetoplasto (▷); observe a célula aflagelada com cinetoplasto redondo (▴) que também parece oriunda de uma divisão atípica. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (com 20% SFB no caso da *H. m. ingenoplastis*) (~27,3°C), com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina menor** (48 h), **barra fina maior** (96 h) e uma **barra larga** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

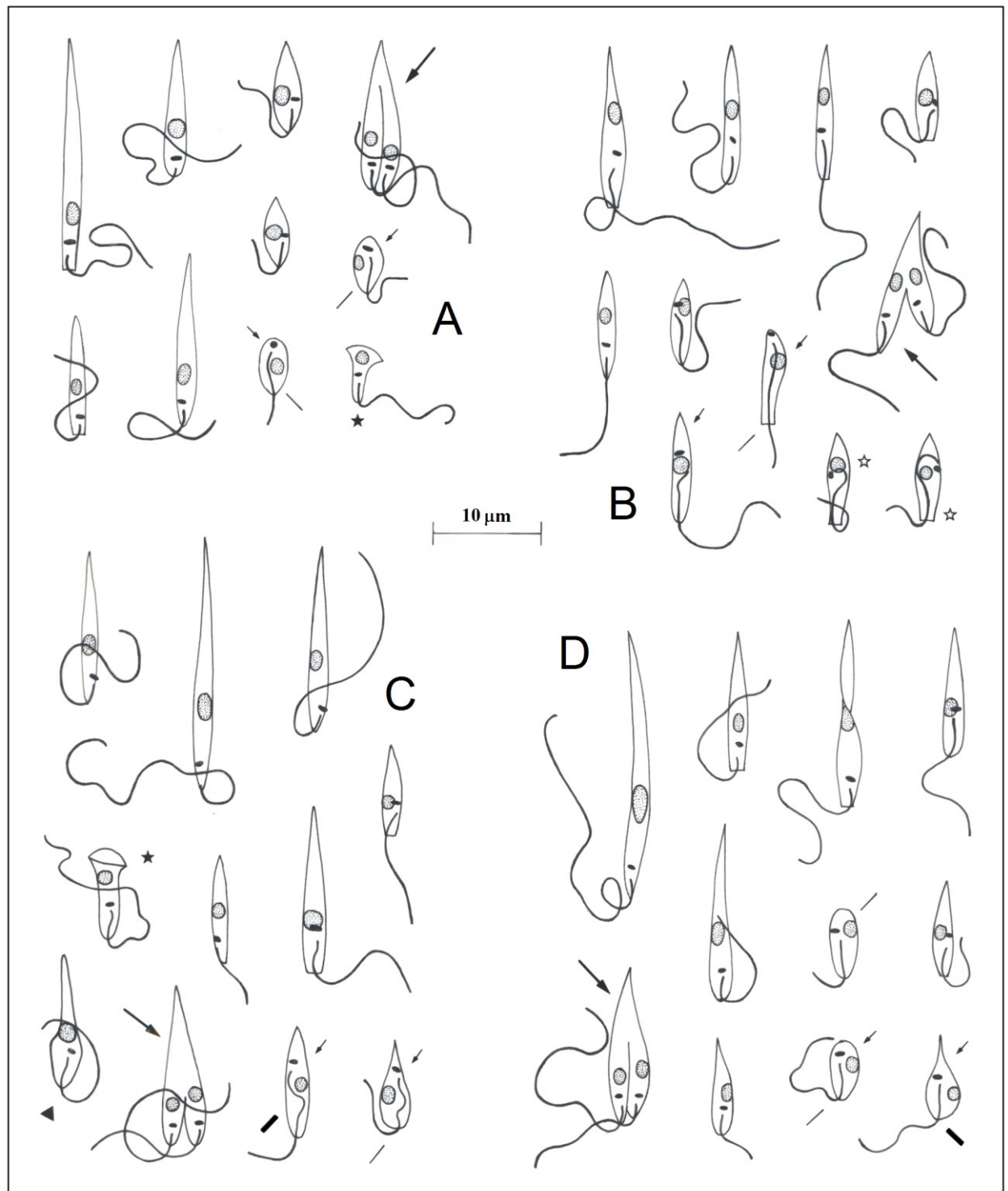


Figura 16: Estágios evolutivos encontrados em *Herpetomonas* isoladas de plantas (A–C) ou de inseto fitófago (D). *Herpetomonas davidi* (isolado de McGhee & Postell, 1976) (A), *Herpetomonas* sp. (E.h.) isolada de *Euphorbia hyssopifolia* (B), *Herpetomonas* sp. (S.l.) isolada de *Solanum lycopersicum* (C) e *Herpetomonas* sp. (L.s.) isolada de *Leptoglossus stigma* (D). Note, além dos estágios flagelados com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**), os estágios com flagelo curvado intracelularmente (**☆**), as células semelhantes a um sino (**★**) e as formas em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Na Fig. C observe também a célula tipo "chupeta" apontada pelo símbolo (**▶**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina** (96 h) e uma **barra larga** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

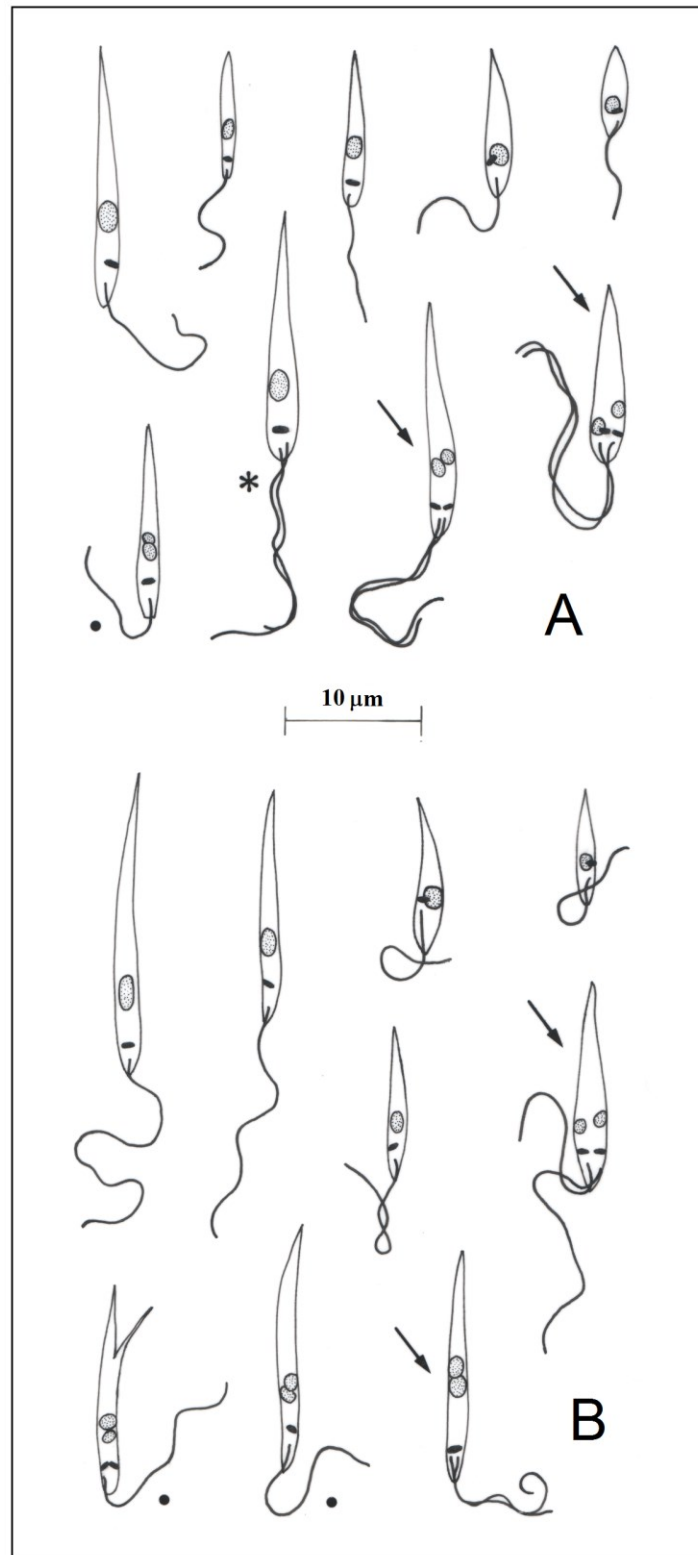


Figura 17: Estágios evolutivos encontrados nas chamadas *Leptomonas* sp. (L.a.-1) isolada de *Lutzomyia ayrozai* (amostra IM3943, clone 1) (A), *Leptomonas* sp. (L.a.-2) isolada de *L. ayrozai* (amostra IM3944, clone 1) (B). Note, além das promastigotas e paramastigotas, a forma biflagelada (*) na Fig. A. Observe os estágios em divisão binária (setas) e as células iniciando o processo (•), uma delas com uma fissura na extremidade posterior do corpo (Fig. B). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (~27,3°C). Todos os desenhos estão na mesma escala.

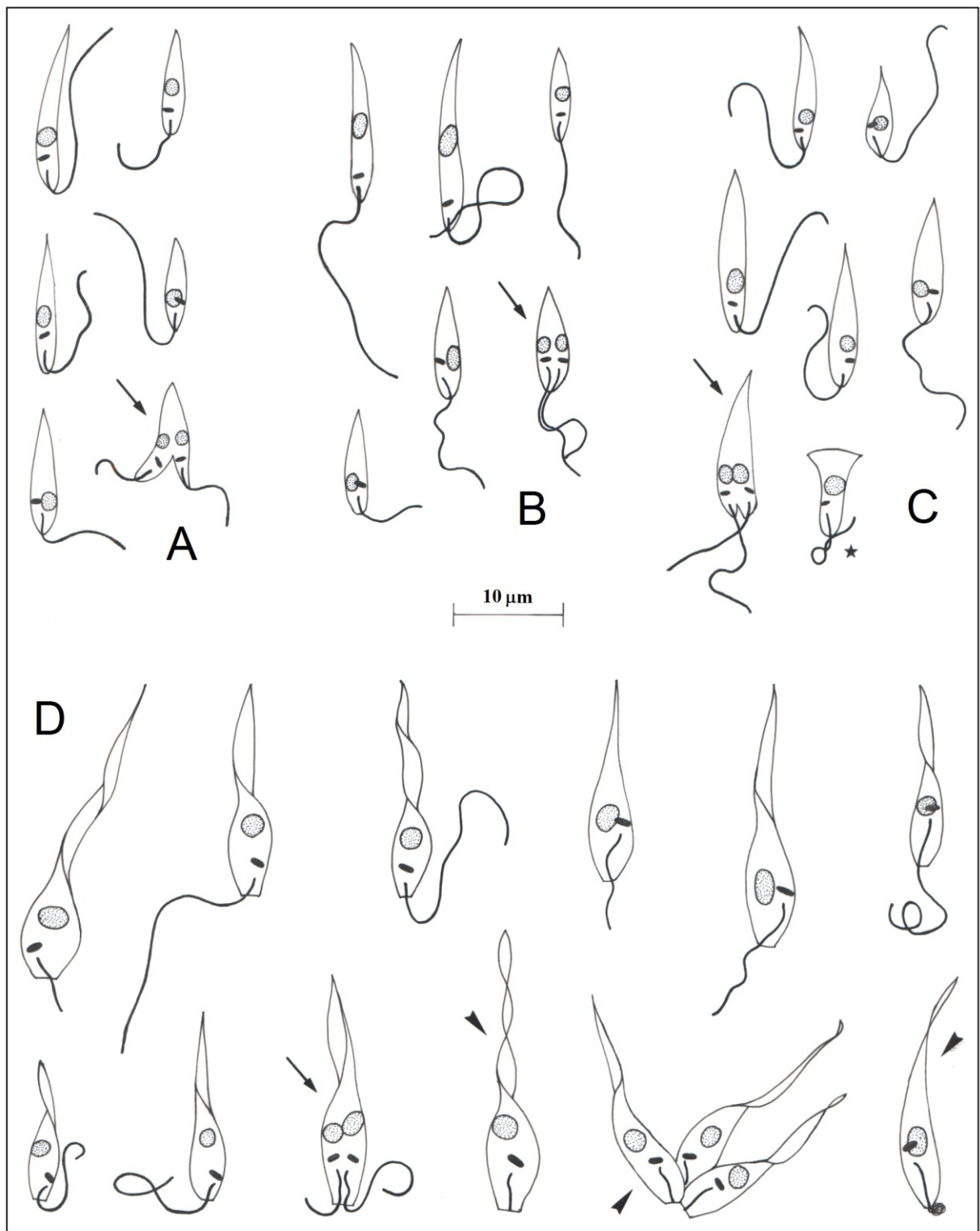


Figura 18: Estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como *Leptomonas pyrrocolhis* (A), *L. seymouri* (B), *L. collosoma* (C) e *L. costoris* (D). Note, além das promastigotas e paramastigotas, a célula semelhante a um sino (★) em *L. collosoma*, além das células sem flagelo livre com cinetoplasto ante- ou paranuclear, isoladas ou em grupo (haptomonas) em *L. costoris* (cabeças de seta). Observe os estágios em divisão binária longitudinal (setas). Note também a extremidade anterior arredondada, o tamanho maior e a presença de células espiraladas em *L. costoris*. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (~27,3°C). Todos os desenhos estão na mesma escala.

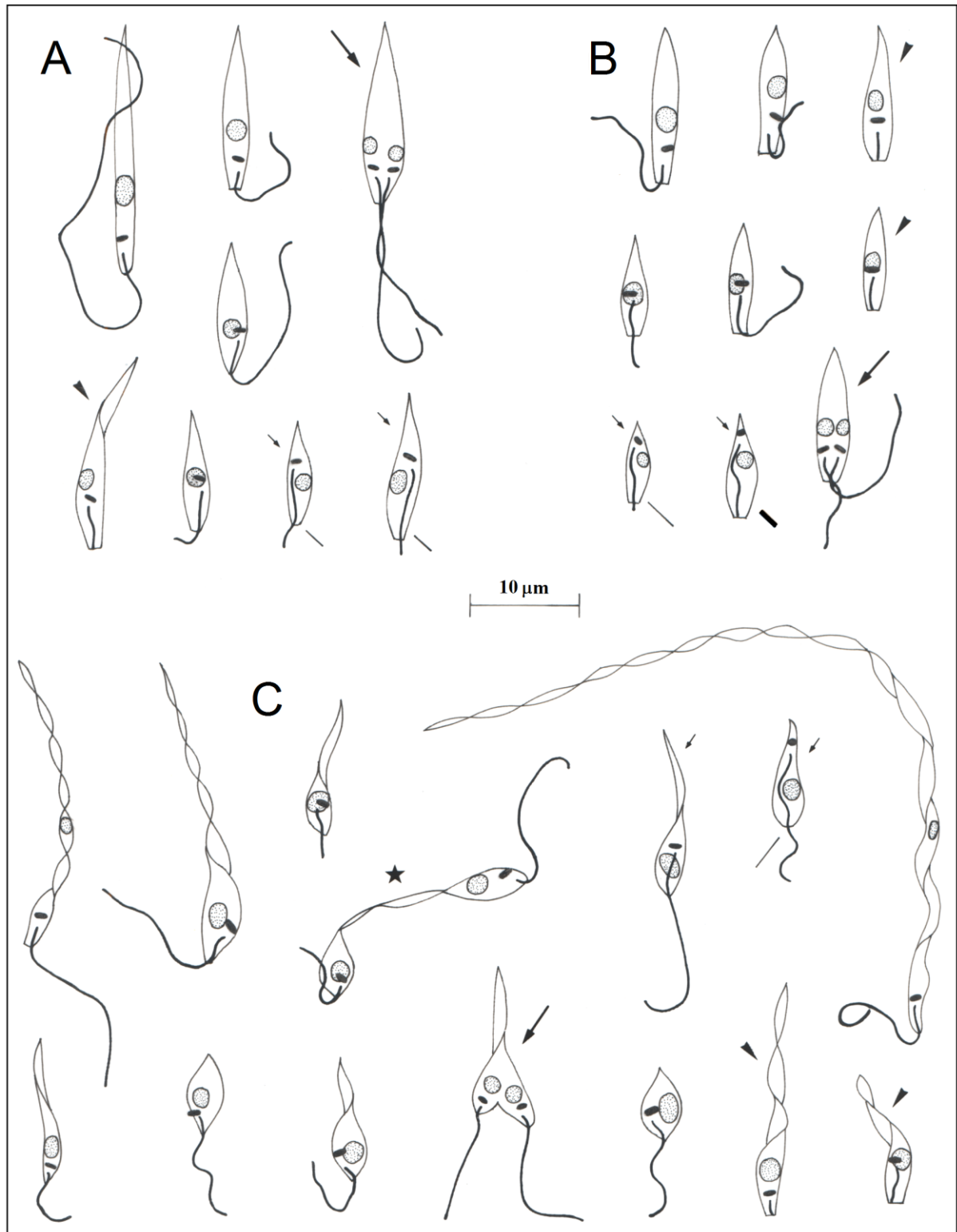


Figura 19: Estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como *Leptomonas samueli* (A), *L. lactosovorans* (B) e *L. mirabilis* (C). Nestas espécies note, além das células com cinetoplasto ante- ou paranuclear, aquelas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**) e os estágios em divisão binária longitudinal (**setas maiores**). Em *L. mirabilis*, note os dois tipos celulares: um deles com a extremidade anterior arredondada e a posterior gradualmente afilada, às vezes com uma ou mais torções; o outro tipo inclui promastigotas finas, espiraladas, alongadas e também, embora raramente, "gigantes" (de grande valor diagnóstico). Note também o par de células unidas (uma promastigota e a outra paramastigota) pelas extremidades posteriores (★) e as células sem flagelo livre com cinetoplasto ante- ou paranuclear (**cabecças de seta**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas (~27,3°C) em LIT ou LIT 20% (*L. mirabilis*) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina menor** (96 h), **barra fina maior** (120 h) e uma **barra larga** (144 h). Desenhos na mesma escala.

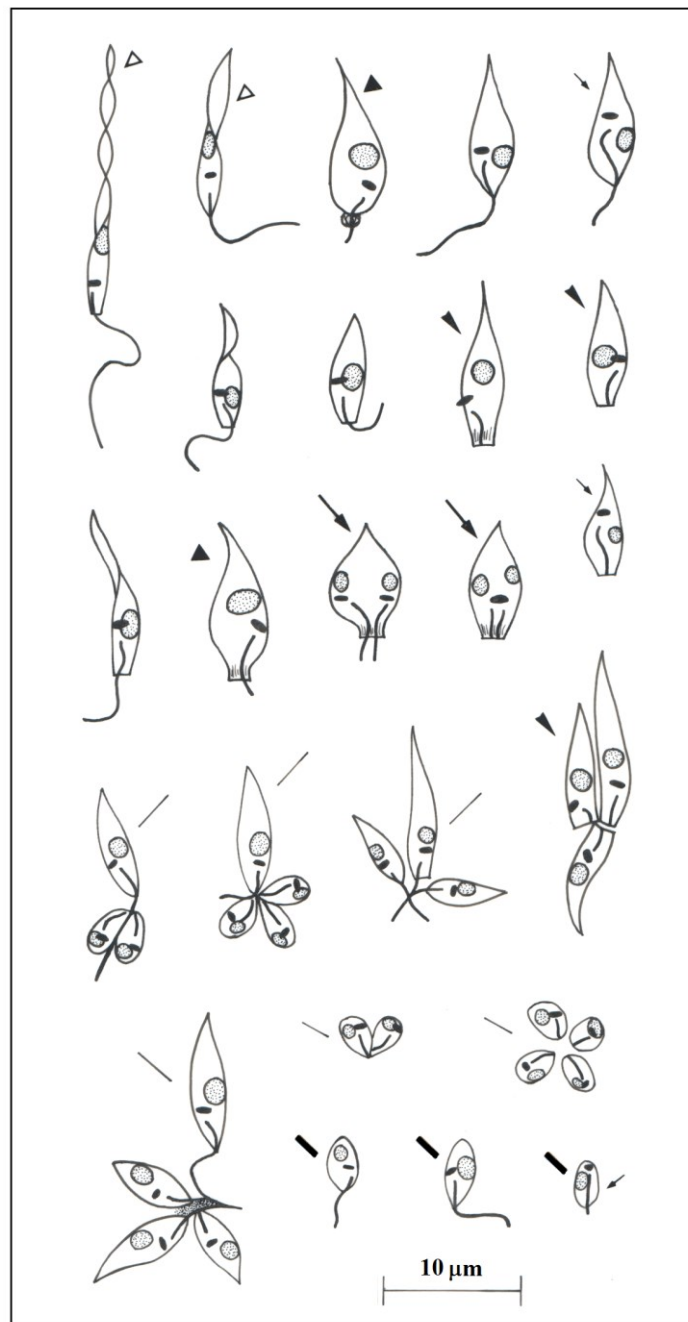


Figura 20: Estágios evolutivos encontrados na chamada *Leptomonas pulexsimulantis*. Note, além das células flageladas em que o cinetoplasto é paranuclear, o acentuado dimorfismo das promastigotas: tipo 1 (▷) e tipo 2 (►); observe também a formação peculiar na base de uma promastigota tipo 2. Note as formas com cinetoplasto posnuclear (**setas menores**) e os estágios em divisão binária, inclusive sem flagelo livre (**setas maiores**). Observe também as formas aflageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, isoladas ou em grupo (**cabeças de seta**), as células com "cistos" flagelares (**barras finas maiores**), os "cistos" desprendidos (**barras finas menores**), além das pequenas formas flageladas com cinetoplasto em diferentes posições (**barras largas**), as quais parecem derivadas destes "cistos". Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por **barras** (120 h) e **setas menores** (144 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

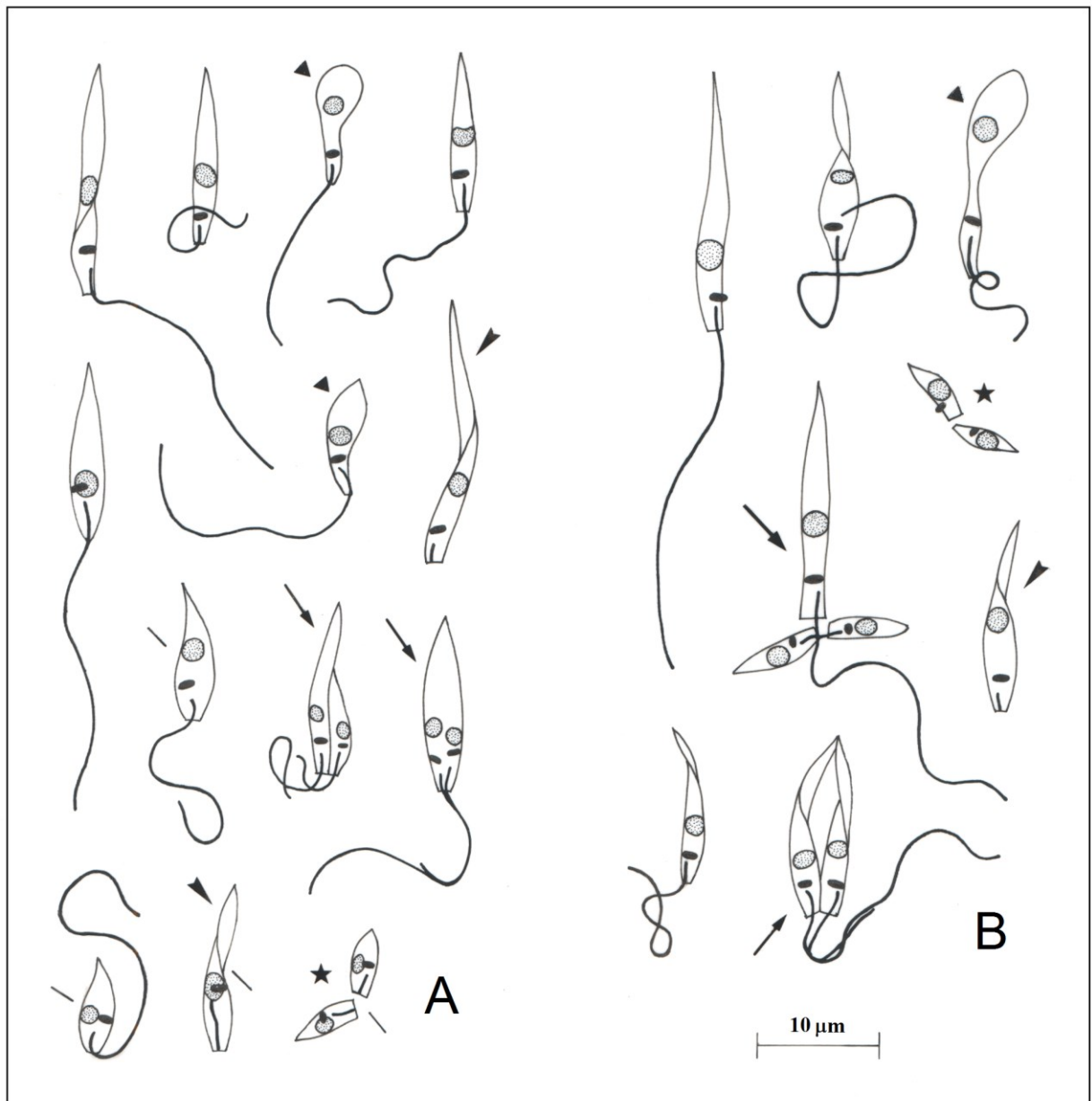


Figura 21: Estágios evolutivos encontrados em amostras identificadas como *Leptomonas wallacei* (clone B) **(A)** e *Leptomonas sp.* (O.v.) (amostra 36/429 TD) isolada de *Oncopeltus varicolor* **(B)**. Note que, além das promastigotas comuns (tipo 3), ocorre um outro tipo cuja extremidade posterior é alargada e freqüentemente arredondada, tendo o núcleo posicionado nesta região ou próximo (tipo 4) (▶). Observe as paramastigotas flageladas (Fig. A) e as células sem flagelo livre e com cinetoplasto ante- ou paranuclear (**cabecãs de seta**), algumas parecendo "cistos" flagelares liberados (★). Note também os estágios em divisão binária (**setas menores**), incluindo aquele em que uma das células é menor. Na Fig. B, observe a promastigota com "cistos" flagelares (seta maior). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (com 20% SFB, no caso da *Leptomonas sp.* isolada de *O. varicolor*) (~27,3°C), com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina** (96 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

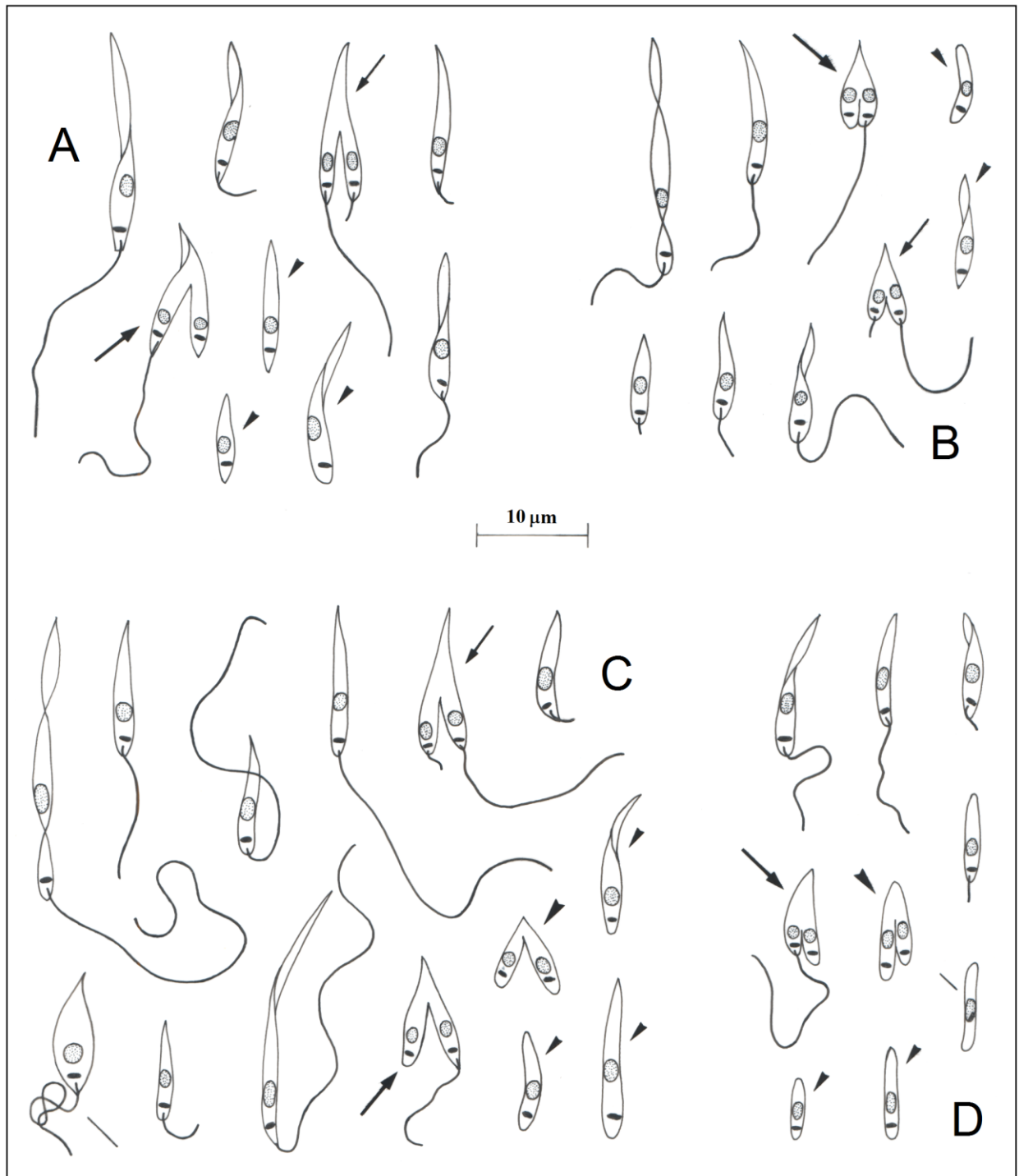


Figura 22: Estágios evolutivos encontrados em *Phytomonas serpens* (amostra 9T) (A), *Phytomonas* sp. (C.b.) isolada de *Citrus bergamia* (B), *P. macgheeii* (= "*H.*" *macgheeii*) (amostra 163M, clone A) (C) e *Phytomonas* sp. (A.c.) isolada de *Allamanda cathartica* (D). Note as promastigotas e a variação no tamanho do corpo e/ou do flagelo, esta sendo mais acentuada em *P. macgheeii* (C); nesta espécie, observe também a célula alargada (**barra fina maior**). Note as células sem flagelo livre com cinetoplasto antenuclear (**cabeças de seta menores**); na Fig. D, uma forma aflagelada com cinetoplasto paranuclear está indicada por uma barra fina pequena. Observe os estágios em divisão binária longitudinal (**setas menores**), em especial aqueles que originam uma célula sem flagelo livre (**setas maiores**); note também as formas aflageladas em divisão (**cabeças de setas maiores**). Observe as células com uma ou mais torções no corpo. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina menor** (96 h) e uma **barra fina maior** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

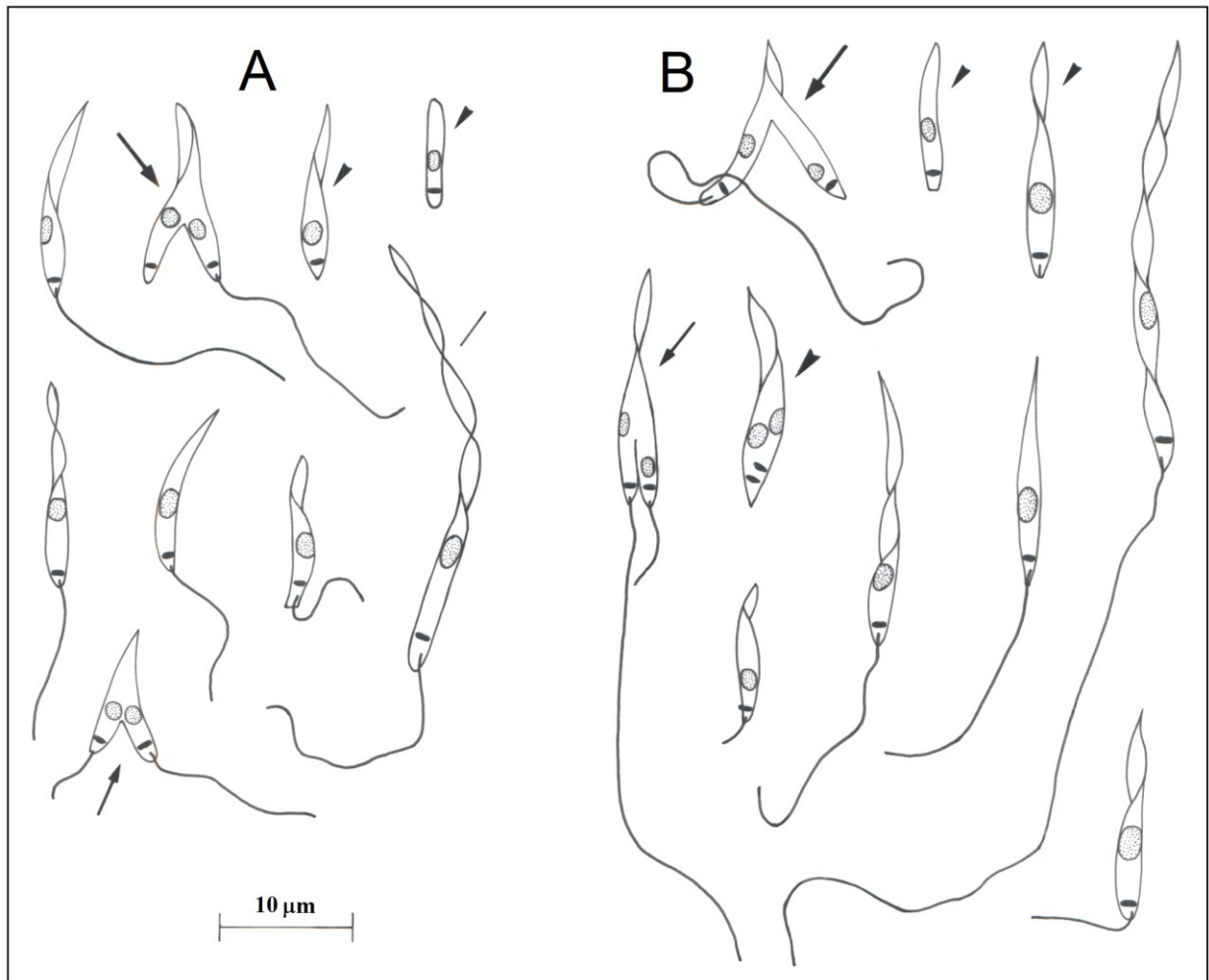


Figura 23: Estágios evolutivos encontrados em *Phytomonas* sp. (E.p.) isolada de *Euphorbia pinea* (amostra EM1) (A) e *Phytomonas* sp. (E.c.) isolada *E. characias* (amostra EC2) (B). Note as promastigotas e a variação no tamanho do corpo e do flagelo, particularmente na *Phytomonas* sp. (E.c.). Observe as células sem flagelo livre com cinetoplasto antenuclear (**cabeças de seta menores**). Note os estágios em divisão binária longitudinal (**setas menores**), em especial aqueles que originam uma célula sem flagelo livre (**setas maiores**); note também a forma aflagelada em divisão (**cabeça de seta maior**). Observe as células com uma ou mais torções no corpo. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (com 20% SFB no caso da *Phytomonas* sp. isolada de *E. characias*) (~27,3°C), com exceção daquela indicada na Fig. A por uma **barra fina** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

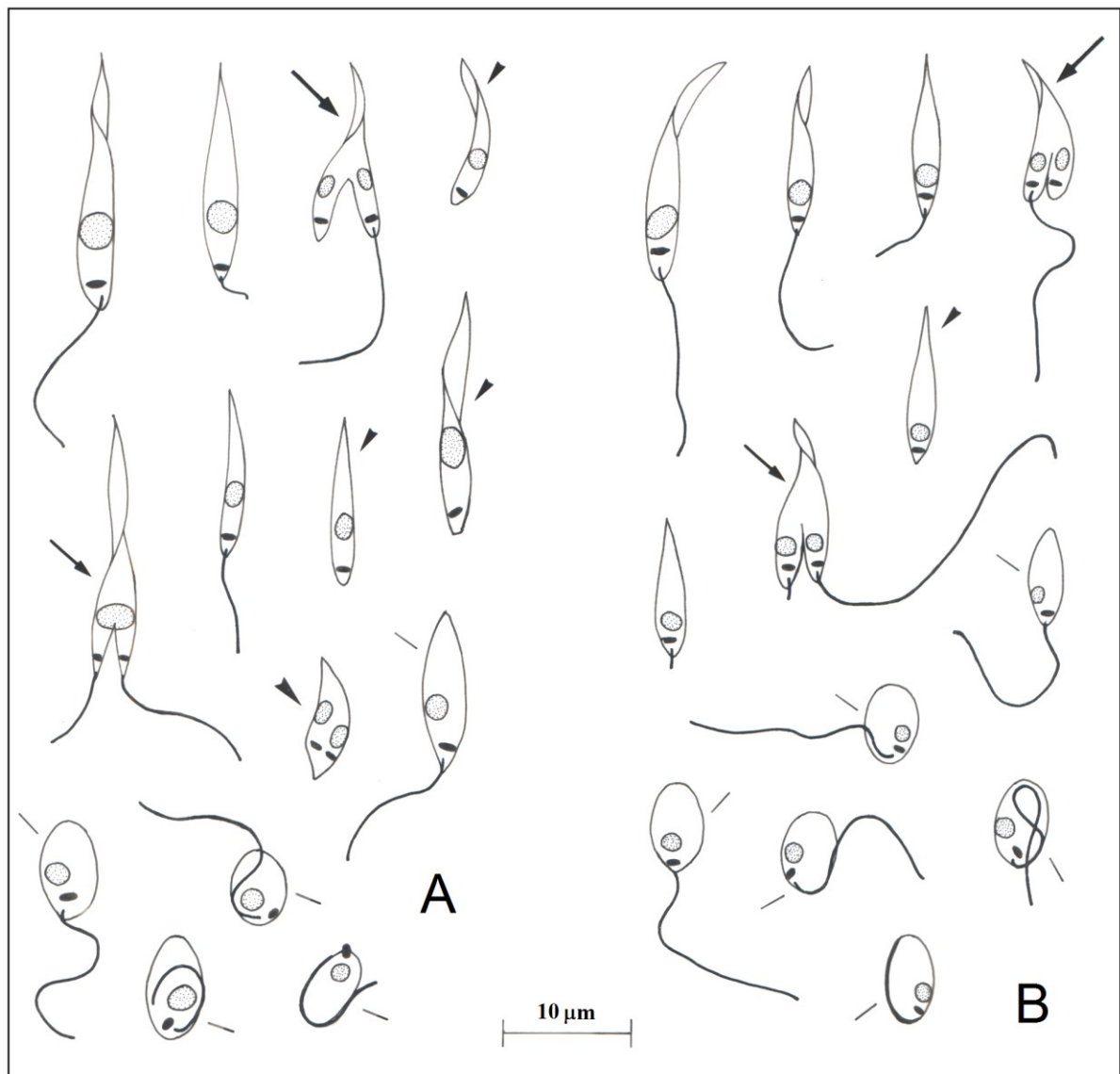


Figura 24: Estágios evolutivos encontrados em *Phytomonas francai* (A) e *Phytomonas* sp. (J.m.) isolada de *Jathropha macrantha* (B). Note as promastigotas e a variação no tamanho do flagelo. Observe as células sem flagelo livre com cinetoplasto antenuclear (**cabeças de seta menores**). Note os estágios em divisão binária longitudinal (**setas menores**), em especial aqueles que originam uma célula sem flagelo livre (**setas maiores**); note também a forma aflagelada em divisão (**cabeça de seta maior**). Observe as células com torção no corpo, além das formas alargadas, algumas com flagelo total ou parcialmente aderido ao corpo (**barras finas**). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (com 20% SFB, no caso da *P. francai*) (~27,3°C), com exceção daquelas indicadas por uma **barra fina** (120 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

3.4. Análise morfométrica de estágios evolutivos encontrados em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros

Os principais estágios evolutivos encontrados nas amostras selecionados para o presente estudo foram analisados por parâmetros biométricos selecionados (item 2.7). Estes resultados estão apresentados nas Tabelas XIV–XXV. Cada estágio foi analisado em separadamente, uma vez que, durante o processo de diferenciação celular, variações importantes podiam ocorrer em suas dimensões.

Padronizamos analisar todos os estágios com cinetoplasto antenuclear ou paranuclear das amostras em estudo às 72 h de cultivo em LIT ou LIT 20% SFB. Quando um destes estágios era dimórfico, como ocorreu com as promastigotas das espécies de *Leptomonas* cistogênicas, os diferentes tipos também foram analisados em separado, mas também às 72 h de cultivo.

Já os estágios mais diferenciados, como opistomastigotas, metacoanomastigotas (opistomorfas), endomastigotas, endocoanomastigotas e "cistos" flagelares, precisaram ser medidos também em outros horários e, muito excepcionalmente, procederam de um meio de cultura diferente, como os "cistos" flagelares de *L. wallacei*.

Quando um mesmo estágio com cinetoplasto ante- ou paranuclear, ou mesmo posnuclear, apresentava notória variação em suas dimensões ao longo do crescimento em cultura, suas medidas também foram tomadas e analisadas em diferentes horários. Entretanto, no presente trabalho, as variações observadas em "*C.*" *oncopelti*, *L. pyrrocoris* e *P. macgheeii* não foram analisadas biometricamente.

3.4.1. Análise morfométrica de estágios flagelados com cinetoplasto antenuclear

A análise morfométrica dos estágios flagelados com cinetoplasto antenuclear nas amostras com a forma coanomastigota (procoanomastigotas) evidenciou que elas eram menores em duas espécies: *A. deanei* e "*H.*" *roitmani* (Tabela XIV, Fig. 11). Excluindo estas amostras, nas procoanomastigotas, as médias variaram entre • 7,2µm (*C. harmosa* e "*C.*" *desouzai*) e 10,6µm {*C. fasciculata* (cepa *Anopheles*)} no **comprimento do corpo (C)**, • 2,4µm {*C. flexonema*, *Crithidia* sp. (Z.1.) e *C. acanthocephali*} e 3,0µm ("*C.*" *oncopelti*) **na largura (L)**, • 2,9 (*C. harmosa* e "*C.*" *oncopelti*) e 4,3 {*C. fasciculata* (cepa *Anopheles*)} **na razão C/L**, • 5,4µm (*C. flexonema*) a 10,7µm (*C. luciliae*) no **comprimento do flagelo (F)**, • 0,7 (*C. luciliae* e *C. acanthocephali*) e 1,4 {*C. fasciculata* (cepa *Culex*), *C. luciliae thermophila* e *W. brevicula*} no **índice nuclear (IN)**. Estes resultados estão detalhados na Tabela XIV.

Com exceção de *H. muscarum ingenoplastis*, que é extraordinariamente grande (Tabela XV; Fig. 15 B), e de *H. pessoai* e *H. anglusteri* (Tabela XV; Fig. 14 A, B), que são relativamente

pequenas e largas (razão **C/L** semelhantes àquela das espécies com coanomastigotas), as promastigotas das demais amostras classificadas como *Herpetomonas* apresentaram médias que variaram entre • 11,5µm {*Herpetomonas* sp. (E.h.)} a 16,0µm {*Herpetomonas* sp. (L.s.)} no **comprimento do corpo (C)**, • 1,7µm {*H. davidi*, *Herpetomonas* sp. (S.I.)} a 2,0µm (*H. mariadeanei*, *H. megaseliae*) na **largura (L)**, • 6,2 {*Herpetomonas* sp. (E.h.)} a 9,1 {*Herpetomonas* sp. (L.s.)} na razão **C/L**, • 10,0µm (*H. megaseliae*) e 17,9µm (*H. mariadeanei*) no **comprimento do flagelo (F)**, • 1,0 {*Herpetomonas* sp. (E.h.)} e 1,7 (*H. mariadeanei*, *H. megaseliae*) no **índice nuclear (IN)**. A amostra *H. muscarum ingenoplastis* apresentou medidas semelhantes em suas formas mono- e biflageladas, com médias do comprimento do corpo e do flagelo, respectivamente, de 23,4µm e 28,3µm (moflageladas) e 25,9µm e 29,2µm (biflageladas). Ver Tabela XV.

As promastigotas das amostras classificadas como *Leptomonas* apresentaram médias que variaram entre • 12,0µm (*L. lactosovorans*) e 18,7µm (*L. samueli*) no **comprimento do corpo (C)**, • 1,5µm {*Leptomonas* sp. (L.a.-2)} e 3,3µm (*L. costoris*) na largura **(L)**, • 5,4 (*L. lactosovorans*) e 9,3 (*Leptomonas* sp. (L.a.-2)) na **razão C/L**, • 6,7µm (*L. pulexsimulantis*) e 21,6µm {*L. leptomonas* sp. (O.v.)} no **comprimento do flagelo (F)**, • 1,1 (*L. lactosovorans* e *L. wallacei*) e 2,8 (*L. mirabilis*) no **índice nuclear (IN)**. Ver Tabela XVI. Ressaltamos que os resultados apresentados nesta tabela procederam da análise de células selecionadas ao acaso. Os diferentes tipos de promastigotas encontrados nas *Leptomonas* cistogênicas também foram medidos separadamente (ver a seguir; Tabela XVII). Por outro lado, as células gigantes de *L. mirabilis* (Fig. 19 C), por serem raras, não foram incluídas na amostragem medida apresentada na Tabela XVI, pois causariam grande distorção nos resultados.

Os resultados da análise biométrica realizada nos diferentes tipos de promastigotas vistos nas *Leptomonas* cistogênicas estão apresentados na Tabela XVII. Em *L. pulexsimulantis*, os tipos encontrados (Fig. 20, **tipos 1 e 2** indicados por ▷ e ►, respectivamente) diferiram entre si quanto às médias do **comprimento do corpo (C)** e do **flagelo (F)**, da **largura (L)** e da **razão C/L**, mas não do **índice nuclear (IN)**. Já os dois tipos de promastigotas encontrados em *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.) eram semelhantes em ambas espécies, mas diferentes daqueles de *L. pulexsimulantis*. Estes, identificados como **tipos 3 e 4**, diferiram entre si nos parâmetros acima citados, com exceção do tamanho do flagelo (Fig. 21 A, B, tipo 4, ►).

Nas amostras de *Phytomonas*, as médias variaram entre • 10,3µm {*Phytomonas* sp. (A.c.)} e 21,9µm {*Phytomonas* sp. (E.c.)} no **comprimento do corpo (C)**, • 1,4µm {*Phytomonas* sp. (A.c.)} e 2,3µm (*P. francai*) na **largura (L)**, • 6,4 {*Phytomonas* sp. (J.m.)} a 12,0 {*Phytomonas* sp. (E.c.)} na **razão C/L**, • 7,6µm (*Phytomonas* sp. (A.c.)} a 25,6µm (*Phytomonas* sp. (E.c.)} no **comprimento do flagelo (F)**, • 1,3 {*Phytomonas* sp. (A.c.)} a 2,7 {*Phytomonas* sp. (J.m.)} no

índice nuclear (IN). Estes resultados estão detalhados na Tabela XVIII, chamando atenção a variação muito acentuada nas médias e no desvio padrão do comprimento do flagelo nas espécies estudadas. Considerando os dados de comprimento do flagelo nos indivíduos de cada amostra (dados não mostrados), a menor variação foi encontrada em *P. francai* (2,5µm–26,0µm) e a maior em *Phytomonas* sp. (E.c.) (1,5µm–68,0µm). Além do mais, todas as espécies analisadas apresentaram promastigotas aflageladas.

Considerando as formas com cinetoplasto antenuclear (promastigotas e procoanomastigotas), observamos que na maioria das espécies analisadas a diferença entre as médias do **comprimento do corpo (C)** e do **flagelo (F)** era relativamente pequena. Contudo, em algumas espécies, esta diferença era mais acentuada. Em *C. fasciculata* (cepa *Anopheles*), *C. flexonema*, *W. brevicula*, *H. megaseliae*, *L. lactosovorans*, *L. mirabilis*, *L. pulexsimulantis*, *P. serpens*, *Phytomonas* sp. (C.b.), *Phytomonas* sp. (A.c) e *P. francai*, **a média do comprimento do corpo era maior do que a do flagelo** (diferenças > 2,0µm). Ao contrário, em *C. harmonosa*, *H. mariadeanei*, *H. muscarum ingenoplastis*, *Herpetomonas* sp. (E.h.), *L. pyrchoris*, *L. wallacei*, *Leptomonas* sp. (O.v.), *P. macgheeii* e *Phytomonas* sp. (E.c.), **a média do comprimento do flagelo era maior do que a do corpo** (diferenças > 2,0µm). Estes resultados estão detalhados nas Tabelas XIV–XVIII.

3.4.2. Análise morfométrica de estágios flagelados com cinetoplasto paranuclear

Quando comparadas com as formas com cinetoplasto antenuclear, aquelas com cinetoplasto paranuclear (paramastigotas e paracoanomastigotas) de uma mesma espécie apresentaram expressivas diferenças em suas dimensões, estas últimas, em geral, sendo menores no comprimento do corpo e do flagelo, além de proporcionalmente mais largas. Comparando as médias do **comprimento do corpo (C)** entre as formas com cinetoplasto ante- e paranuclear em uma mesma espécie, observamos que diferenças pequenas (< 0,5µm) só foram encontradas em *C. guilhermei*, *C. harmonosa*, *L. costoris* e *L. mirabilis* (Tabelas XIV, XVI; Figs 5 C, 9 B, 18 D, 19 C). Comparando as médias do **comprimento do flagelo (F)** entre os estágios com cinetoplasto ante- e paranuclear em uma mesma espécie, observamos que o flagelo era menor nos últimos em todas as amostras (Tabelas XIV–XVI), exceto em *C. luciliae* (Fig. 5 D).

As médias menores observadas na **razão C/L** em paramastigotas ou paracoanomastigotas das espécies estudadas refletem o alargamento proporcional do corpo do parasita quando ocorre a diferenciação celular com a migração do cinetoplasto da posição antenuclear para a paranuclear (Tabelas XIV–XVI).

Nos tripanosomatídeos com forma predominantemente coanomastigota, a diferença entre as médias das **razões C/L** entre as procoanomastigotas e paracoanomastigotas de cada

espécie variou entre 0,1–1,0, sendo que as menores foram observadas em *C. hamosa* (0,1), *C. guilhermei* e "*C.*" *oncopelti* (0,2), *C. acanthocephali* e *A. deanei* (0,3), enquanto as maiores foram encontradas em *C. fasciculata* (cepa *Anopheles*), *W. inconstans* e "*C.*" *desouzai* (0,8), *C. flexonema* (0,9), *C. fasciculata* (cepa *Culex*) e *C. ricardoi* (1,0).

Nas amostras classificadas como *Herpetomonas*, a diferença entre as médias da **razão C/L** das promastigotas e paramastigotas de cada espécie variou entre 0,8–5,3, as menores tendo sido apresentadas por *H. pessoai* (0,8) e *H. anglusteri* (1,2), enquanto as maiores foram observadas em *Herpetomonas* sp. (S.l.), *Herpetomonas* sp. (L.s.) (4,4), *H. davidi* (4,7) e *H. muscarum ingenoplastis* (5,3).

Nas amostras classificadas como *Leptomonas* a diferença entre as médias da **razão C/L** das promastigotas e paramastigotas de cada espécie variou entre 0,6–3,9, as menores tendo sido apresentadas por *L. costoris* e *L. mirabilis* (0,6) e *L. lactosovorans* (1,2), enquanto as maiores foram observadas em *L. wallacei* (2,2), *Leptomonas* sp. (L.a.-2) e *L. pyrrocoris* (3,4), *Leptomonas* sp. (L.a.-1) e *L. samueli* (3,9).

Estes resultados estão detalhados nas Tabelas XIV–XVI e indicam quais, entre as amostras estudadas, são as mais largas e curtas (valores menores de **C/L**) e quais são as mais alongadas (valores maiores de **C/L**) ao se diferenciarem para paramastigotas ou paracoanomastigotas. Contudo, o valor deste índice pode ser relativo em espécies como *L. costoris* e *L. mirabilis*, que apresentam células com acentuada diferença na largura da porção anterior e posterior do corpo, a primeira frequentemente sendo mais alargada (Figs 18 D, 19 C).

Entre as amostras analisadas, as menores formas com cinetoplasto paranuclear foram encontradas em *A. deanei*, "*C.*" *desouzai* e "*H.*" *roitmani*, com médias de 5,1–5,5µm (Tabela XIV; Fig. 11). Nas demais espécies com a forma coanomastigota, os estágios com cinetoplasto paranuclear apresentaram médias que variaram entre: • 6,7µm (*C. luciliae thermophila*) e 9,4µm (*C. guilhermei*) no **comprimento do corpo (C)**, • 2,3µm [*Crithidia* sp. (Z.l.) e *C. acanthocephali*] e 3,2µm [*C. fasciculata* (cepa *Culex*)] na **largura (L)**, • 2,4 [*C. fasciculata* (cepa *Culex*)] e 3,5 [*C. fasciculata* (cepa *Anopheles*)] na **razão C/L**, • 3,2µm (*C. flexonema*) e 11,6µm (*C. luciliae*) no **comprimento do flagelo (F)**, • 0,9 [*C. fasciculata* (cepa *Culex*)] e 1,6 [*C. fasciculata* (cepa *Anopheles*)] no **índice nuclear (IN)**. Estes resultados estão detalhados na Tabela XIV.

Excetuando *H. muscarum ingenoplastis*, que apresenta taxas muito baixas de paramastigotas (~0,5%), além de *H. pessoai* e *H. anglusteri*, que são mais alargadas (Fig. 14 A, B), nas demais amostras classificadas como *Herpetomonas*, as paramastigotas apresentaram médias que variaram entre • 8,1µm (*H. davidi*) e 12,4µm (*H. megaseliae*) no **comprimento do corpo (C)**, • 2,1µm [*Herpetomonas* sp. (E.h.)] e 2,5µm (*H. davidi*) na **largura (L)**, • 3,2 (*H. davidi*)

e 5,4 (*H. megaseliae*) na **razão C/L**, • 6,3µm (*H. davidi*) e 14,4µm (*H. mariadeanei*) no **comprimento do flagelo (F)** e • 1,0 (*Herpetomonas* sp. (E.h.)) e 2,0 (*H. mariadeanei* e *H. megaseliae*) no **índice nuclear (IN)**. Estes resultados estão detalhados na Tabela XV.

Nas amostras classificadas como *Leptomonas*, as paramastigotas apresentaram médias que variaram entre • 8,2µm (*Leptomonas* sp. (L.a.-1)) e 17,3µm (*L. costoris* e *L. mirabilis*) no **comprimento do corpo (C)**, • 1,7µm (*Leptomonas* sp. (L.a.-2)) e 3,5µm (*L. costoris*) na **largura (L)**, • 3,9 (*L. pulexsimulantis*) e 6,0 (*L. mirabilis*) na **razão C/L**, • 4,6µm (*L. pulexsimulantis*) e 17,9µm (*L. wallacei*) no **comprimento do flagelo (F)** e • 1,4 (*L. lactosovorans*) e 4,1 (*L. mirabilis*) no **índice nuclear (IN)**. Estes resultados estão apresentados na Tabela XVI.

3.4.3. Análise morfométrica de estágios sem flagelo livre e com cinetoplasto ante- ou paranuclear

Em diversas amostras que têm a forma coanomastigota, como a maioria das espécies identificadas como *Crithidia* e nas duas espécies de *Wallaceina*, foram encontradas formas aflageladas muito peculiares (Tabela VI, indicadas com ☆), com cinetoplasto antenuclear ou mais freqüentemente paranuclear, o núcleo mais próximo da extremidade posterior, esta geralmente arredondada, e a extremidade anterior truncada, usualmente alargada e mais corada pelo Giemsa. Tais formas podiam ocorrer isoladas, aos pares ou em grupos maiores, parecendo adaptadas à adesão (haptomonas) (Figs 5–8, 10, indicadas com *). Em geral, estas formas eram menores que as flageladas e, curiosamente, apresentavam dimensões semelhantes na maioria das amostras em que foram encontradas (Tabela XIX, ☆). Aquelas com cinetoplasto antenuclear apresentaram médias que variaram entre • 5,6–7,2µm no **comprimento (C)**, • 2,4–3,1µm na **largura (L)**, • 2,0–2,6 na **razão C/L** e • 0,3–0,5 no **índice nuclear (IN)**. Naquelas com cinetoplasto paranuclear, as médias variaram entre • 5,2–7,3µm (C), • 2,4–2,9µm (L), • 1,9–2,8 (C/L) e • 0,4–0,8 (IN). Estes resultados estão detalhados na Tabela XIX.

Nas espécies não assinaladas com ☆ nas Tabelas VI e XIX, também foram encontradas formas aflageladas, mas usualmente isoladas e não tão típicas, especialmente aquelas de "*C. oncopelti*" (Fig. 12, cabeça de seta). A Tabela XIX apresenta seus dados biométricos. É interessante observar que as células aflageladas das amostras com coanomastigotas diferiam consideravelmente daquelas encontradas em tripanosomatídeos classificados nos gêneros *Leptomonas* e *Phytomonas*. Compare os dados da Tabela XIX com aqueles das Tabelas XX e XXI, além das ilustrações de formas aflageladas das Figs 5–10, 13 (*) e 11 (cabeças de seta) com aquelas das Figs 18 D e 19–24 (cabeças de setas).

Entre as espécies classificadas no gênero *Leptomonas*, as promastigotas aflageladas apresentaram médias que variaram entre • 10,7µm (*L. pulexsimulantis*) e 18,1µm (*L. mirabilis*)

no **comprimento do corpo (C)**, • 2,2 μ m (*L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.)) e 3,4 μ m (*L. costoris*) na **largura (F)**, • 3,8 μ m (*L. pulexsimulantis*) e 7,5 μ m (*L. mirabilis*) na **razão C/L** e • 1,2 (*L. lactosovorans*) e 3,2 (*L. mirabilis*) no **índice nuclear (IN)**. Nas espécies que também possuíam paramastigotas aflageladas, as médias variaram entre • 10,1 μ m (*L. lactosovorans*) e 17,4 μ m (*L. mirabilis*) no **comprimento do corpo (C)**, • 2,3 μ m (*L. lactosovorans*) e 3,6 μ m (*L. costoris*) na **largura (L)**, • 3,7 (*L. pulexsimulantis*) e 7,2 (*L. mirabilis*) na **razão C/L** e • 1,3 (*L. lactosovorans*) e 4,4 (*L. mirabilis*) no **índice nuclear (IN)**. Neste grupo, quando a espécie possuía os dois estágios, estes apresentaram dados biométricos próximos, embora em *L. mirabilis* o **índice nuclear médio** fosse relativamente maior nas paramastigotas. Estes resultados estão detalhados na Tabela XX. As formas aflageladas das amostras identificadas como *Leptomonas* estão ilustradas nas Figs 18 D, 19–21 (cabeças de seta). A diferença de tamanho observada entre pro- e paramastigotas aflageladas de *L. wallacei* pode ser apenas uma decorrência da redução do corpo de todos os seus estágios com o tempo de cultivo (Tabela XXV). Os "cistos" flagelares encontrados em três espécies de *Leptomonas* foram analisados no item 3.4.4.

Promastigotas aflageladas foram encontradas em todas as espécies de *Phytomonas* analisadas e apresentaram médias que variaram entre • 7,7 μ m (*Phytomonas* sp. (A.c.)) e 15,5 μ m (*Phytomonas* sp. (Ec.)) no **comprimento do corpo (C)**, • 1,3 μ m (*Phytomonas* sp. (A.c.)) e 2,0 μ m (*Phytomonas* sp. (E.c.)) na **largura (L)**, • 5,8 (*Phytomonas* sp. (C.b.)) e 7,9 (*Phytomonas* sp. (E.c.)) na **razão C/L** e • 1,3 (*Phytomonas* spp. (C.b.) e (A.c.)) e 2,1 (*Phytomonas* sp. (J.m.)) no **índice nuclear (IN)**. Estes resultados estão detalhados na Tabela XXI.

3.4.4. Análise morfométrica de "cistos" flagelares encontrados em tripanosomatídeos classificados no gênero *Leptomonas*

Entre as amostras aqui estudadas e classificadas no gênero *Leptomonas*, três apresentaram "cistos" flagelares aderidos à célula-mãe ou livres (Figs 20, 21). Diversos destes "cistos" não apresentavam flagelo livre visível ao M.O. e os mesmos foram analisados biometricamente em suas fases com cinetoplasto ante- e/ou paranuclear. Em *L. pulexsimulantis*, os "cistos" livres eram muito pequenos, elípticos ou arredondados, com núcleo na extremidade posterior e o cinetoplasto paranuclear (Fig. 20, barras finas menores). Nesta espécie, os "cistos" (livres ou aderidos às células-mãe) apresentavam médias de • 3,7 μ m no **comprimento do corpo (C)**, • 2,0 μ m na **largura (L)**, • 1,9 na **razão C/L** e • 0,4 no **índice nuclear (IN)**. Em *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.), os "cistos" livres tinham a extremidade anterior truncada, a posterior afilada e o cinetoplasto ante- ou paranuclear (Fig. 21, ★). Em *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.), os "cistos" com cinetoplasto antenuclear apresentaram medidas médias muito semelhantes, respectivamente: • 6,5 e 6,3 μ m (**C**), • 1,8 e 1,7 μ m (**L**), • 3,7 (**C/L**) e • 1,1 e 1,2 (**IN**), apesar de procederem de culturas em diferentes

meios (MWM e LIT 20% SFB). "Cistos" flagelares com cinetoplasto paranuclear só foram encontrados em *L. wallacei* e apresentaram as seguintes médias: • 3,9µm (C), • 1,4µm (L), • 2,9 (C/L) e • 0,7 (IN). Estes resultados estão detalhados na Tabela XXII.

3.4.5. Análise morfométrica de estágios com cinetoplasto posnuclear encontrados em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros

Na maioria das espécies que apresentavam formas com cinetoplasto posnuclear (opistomastigotas e metacoanomastigotas/opistomorfas), a média do comprimento do corpo era inferior àquela das formas com cinetoplasto ante- ou paranuclear. Entretanto, em diversas espécies das chamadas *Herpetomonas*, a média do comprimento das opistomastigotas foi muito semelhante àquela das paramastigotas (diferença $\leq 0,2\mu\text{m}$), como em *H. mariadeanei*, *H. megaseliae*, *Herpetomonas* sp. (E.h.) e *Herpetomonas* sp. (S.l.) (Figs 14 C, D, 16 B, C), ou mesmo foi superior ($> 1,0\mu\text{m}$), como em *H. muscarum muscarum* (Fig. 15 A). Compare os dados das Tabelas XV e XXIII. Os resultados das análises biométricas realizadas nos estágios com cinetoplasto posnuclear encontrados em amostras classificadas em diferentes gêneros estão detalhados na Tabela XXIII.

Entre todas as amostras analisadas, as menores formas com cinetoplasto posnuclear foram observadas em *A. deanei*, "*C.*" *desouzai*, "*H.*" *roitmani* (Fig. 11, seta menores), com médias que variaram entre • 4,5–4,7µm no **comprimento do corpo (C)**, 1,9–2,1µm na **largura (L)**, • 2,3–2,5 na **razão C/L**, • 1,1–1,3µm no **comprimento do flagelo (F)** e • 0,9–1,0 no **índice nuclear (IN)**. Excluindo-se estas espécies, como também "*C.*" *oncopelti*, nas demais amostras com metacoanomastigotas, as médias variaram entre • 5,0µm (*C. flexonema*) e 6,9µm (*C. luciliae*) no **comprimento do corpo (C)**, • 2,0µm (*C. luciliae* e *C. harmosa*) e 2,5µm (*C. mellificae*) na **largura (L)**, • 2,3 (*C. mellificae*) e 3,6 (*C. luciliae*) na **razão C/L**, • 0,9µm (*C. acanthocephali*) e 8,4µm (*C. luciliae*) no **comprimento do flagelo (F)** e • 0,7 (*W. brevicula*) e 1,0 (*C. mellificae* e *C. harmosa*) no **índice nuclear (IN)**.

Em "*C.*" *oncopelti* observou-se nítido dimorfismo nas metacoanomastigotas (ver item 3.2.1; Fig. 12, setas menores), mas os resultados apresentados na Tabela XXIII foram obtidos de uma amostragem de células ao acaso. Observe que as médias da **largura (L)**, **razão C/L** e **índice nuclear (IN)** de "*C.*" *oncopelti* não se encaixam nas faixas das demais amostras com metacoanomastigotas.

Nas amostras classificadas como *Herpetomonas* (excluindo-se *H. muscarum ingenoplastis*, além de *H. pessoai* e *H. angusteri*), as médias dos estágios de opistomastigota variaram entre • 6,4µm (*H. davidi*) e 12,6µm (*H. megaseliae*) no **comprimento do corpo (C)**, • 2,0µm (*H. mariadeanei* e *H. megaseliae*) e 2,4µm [*Herpetomonas* sp. (S.l.)] na **largura (L)**, • 2,6 (*H. davidi*) e 6,5 (*H. megaseliae*) na **razão C/L**, • 1,2µm (*H. mariadeanei*) e 6,9µm [*Herpetomonas* sp. (E.h.)] no **comprimento do flagelo**

(F) e \bullet 0,6 (*Herpetomonas* sp. (E.h.)) e 1,6 (*H. mariadeanei*) no **índice nuclear (IN)**.

Opistomastigotas foram encontradas em quatro espécies classificadas como *Leptomonas* e suas médias variaram entre \bullet 7,6 μ m (*L. pulexsimulantis*) e 11,0 μ m (*L. samueli*) no **comprimento do corpo (C)**, \bullet 2,0 μ m (*L. lactosovorans*) e 2,9 μ m (*L. pulexsimulantis*) na **largura (L)**, \bullet 2,7 (*L. pulexsimulantis*) e 5,5 (*L. samueli*) na **razão C/L**, \bullet 0,8 μ m (*L. lactosovorans*) e 10,0 μ m (*L. mirabilis*) no **comprimento do flagelo (F)** e \bullet 0,9 (*L. lactosovorans*) e 2,5 (*L. mirabilis*) no **índice nuclear (IN)**. Ver Tabelas VIII e XXIII e Figs 19, 20 (setas menores).

Na maioria das amostras que apresentaram estágios com cinetoplasto posnuclear, a média do comprimento do flagelo foi semelhante ou inferior àquela do corpo, sendo que em várias espécies, o flagelo podia ter média inferior à metade daquela do comprimento do corpo. Apenas em *C. luciliae*, *H. pessoai* e *H. muscarum ingenoplastis* a média do comprimento do flagelo foi superior à do corpo (Tabela XXIII, Figs 5 D, 14 A, 15 B, setas menores). Na maioria das amostras, as médias do **índice nuclear (IN)** nas formas com cinetoplasto posnuclear foi \leq 1,0, isto significando que nelas o núcleo era geralmente central ou posterior (Tabela XXIII). Os menores valores médios de **IN** foram encontrados em *H. anglusteri* e *Herpetomonas* sp. (E.h.) (0,6), *W. brevicula* e *H. muscarum muscarum* (0,7), e em *C. flexonema* e *H. pessoai* (0,8). Por outro lado, os maiores valores de **IN** foram observados em "*C.*" *oncopelti* e *H. muscarum ingenoplastis* (1,4), em *H. mariadeanei* e *L. pulexsimulantis* (1,6), e *L. mirabilis* (2,5), isto significando que nestas espécies, o núcleo era geralmente posicionado na porção anterior do corpo (Tabela XXIII). Comparando-se as médias do **índice nuclear (IN)** das formas com cinetoplasto posnuclear encontradas nas diferentes amostras analisadas, nota-se que este parâmetro pode ser mais útil para distinguir espécies do que para diferenciar grupos.

3.4.6. Análise morfométrica de endomastigotas e endocoanomastigotas encontradas em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros

Na maioria das espécies, as médias do comprimento do corpo das endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 1 (flagelo não contorna o núcleo; Figs 1 g, h, j-1, 2 h, i) foram menores do que as dos estágios flagelados com cinetoplasto antenuclear (exceção: *A. deanei*, com diferença $>$ 0,4 μ m) ou paranuclear (exceções com diferenças \geq 0,4 μ m: *C. luciliae*, *A. deanei*, *H. pessoai* e *H. anglusteri*). Entretanto, tais médias foram maiores do que as das formas com cinetoplasto posnuclear; as exceções apresentaram diferenças \geq 0,4 μ m (*H. mariadeanei* e *Herpetomonas* sp. (E.h.)) (Tabelas XIV, XV, XXIII, XXIV). Em *C. mellificae*, as médias do comprimento do corpo das endocoanomastigotas do tipo 1 e das metacoanomastigotas foram muito próximas (Tabelas XXIII, XXIV). As endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 1 das espécies estudadas apresentaram médias da **razão C/L** \leq 3,6 (exceção: *Crithidia luciliae*) e

do **índice nuclear (IN)** $\leq 1,0$. Na maioria das espécies, a média do **comprimento do flagelo (F)** foi menor que a do corpo (**C**); exceção: *H. pessoai* (Tabela XXIV). Nas endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 1, as medidas médias variaram entre $\bullet 5,0\mu\text{m}$ ("*H.*" *roitmani*) e $10,3\mu\text{m}$ (*H. anglusteri*) no **comprimento do corpo (C)**, $\bullet 2,2\mu\text{m}$ (*C. flexonema*) e $3,3\mu\text{m}$ (*H. pessoai*) na **largura (L)** e $\bullet 0,3\mu\text{m}$ (*C. luciliae thermophila*) e $9,3\mu\text{m}$ (*H. pessoai*) no **comprimento do flagelo (F)**. Estes resultados estão detalhados na Tabela XXIV.

Nas diversas amostras em que foram encontradas, as endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 2 (flagelo contorna o núcleo; Figs 1 i, 2 i) apresentaram médias do comprimento do corpo geralmente menores que as do tipo 1. As médias mais semelhantes no comprimento dos dois tipos (diferenças $\leq 0,2\mu\text{m}$) foram observadas em *W. brevicula*, "*H.*" *roitmani* e *H. mariadeanei* (Tabela XXIV). Nas diferentes espécies, todas as endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 2 apresentaram médias **da razão C/L** $\leq 3,5$ e do **índice nuclear** $< 0,9$ (Tabela XXIV). Nas endomastigotas ou endocoanomastigotas do tipo 2, as medidas médias variaram entre $\bullet 5,1\mu\text{m}$ ("*H.*" *roitmani*) e $7,7\mu\text{m}$ (*H. mariadeanei* e *Herpetomonas* sp. (E.h.)) no **comprimento do corpo (C)**, $\bullet 2,2\mu\text{m}$ (*H. mariadeanei*) e $2,8\mu\text{m}$ (*W. brevicula*) na **largura (L)** e $\bullet 0,1\mu\text{m}$ (*H. mariadeanei*) e $3,7\mu\text{m}$ (*Herpetomonas* sp. (E.h.)) no **comprimento do flagelo (F)**. Neste estágio, em todas as amostras, a média do flagelo livre foi, no mínimo, duas vezes menor que a do corpo. Estes resultados estão detalhados na Tabela XXIV. Ilustrações de endomastigotas ou endocoanomastigotas estão nas Figs 5 D, 6–8, 9 A, B, 10, 11, 13, 14 A–C, 15 B, 16 B (☆).

3.4.7. Variabilidade morfométrica durante crescimento em cultura observada em tripanosomatídeos classificados em diferentes gêneros

Algumas amostras apresentaram, ao longo de seu crescimento em LIT ou LIT 20% SFB, uma acentuada variação em pelo menos alguns dos parâmetros analisados (Tabela XXV). Em diferentes estágios de "*H.*" *dedonderi*, foi notória a redução na média do **comprimento do corpo (C)**, da **razão C/L** e do **índice nuclear (IN)**, além do aumento da média da **largura (L)** e flutuações no **comprimento do flagelo (F)** (Tabela XXV; Fig. 13). Outras espécies, como *L. wallacei* (Fig. 21 A), *P. macgheeii* (Fig. 22 C), *P. francai* e *Phytomonas* sp. (J.m.) (Figs 24 A, B), apresentaram alterações semelhantes, exceto no tamanho do flagelo. Ao contrário, em *Phytomonas* sp. (E.p.) (23 A), as médias do **comprimento do corpo (C)**, do **flagelo (F)**, da **razão C/L** e do **índice nuclear (IN)** aumentaram com o tempo de cultivo, mas praticamente sem modificar a largura. A Tabela XXV apresenta estes resultados, exceto de *P. macgheeii*. A variação observada em *L. pyrrocoris* no comprimento do corpo e do flagelo das promastigotas com 48 e 72 h em LIT, também não consta da tabela.

TABELA XIV

MORFOMETRIA DE CÉLULAS FLAGELADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS QUE APRESENTAM A FORMA COANOMASTIGOTA (§) E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	procoanomastigotas (cinetoplasto antenuclear)						paracoanomastigotas (cinetoplasto paranuclear)					
	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Anopheles</i>)	50	10,6 ± 1,9	2,5 ± 0,4	4,3 ± 0,8	7,8 ± 2,1	1,2 ± 0,2	30	9,3 ± 1,5	2,7 ± 0,4	3,5 ± 0,6	7,7 ± 1,8	1,6 ± 0,5
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>)	50	9,8 ± 1,7	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,7	8,9 ± 2,8	1,4 ± 0,4	30	7,2 ± 1,6	3,2 ± 0,6	2,4 ± 0,8	8,7 ± 2,3	0,9 ± 0,4
<i>C. guilhermei</i>	50	9,8 ± 1,5	2,7 ± 0,4	3,6 ± 0,7	10,5 ± 2,7	1,0 ± 0,3	30	9,4 ± 1,7	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,8	9,3 ± 2,6	1,2 ± 0,4
<i>C. luciliae</i>	50	9,5 ± 1,3	2,5 ± 0,4	3,8 ± 0,7	10,7 ± 4,0	0,7 ± 0,2	30	8,1 ± 1,1	2,6 ± 0,3	3,2 ± 0,5	11,6 ± 4,0	1,0 ± 0,3
<i>C. ricardoii</i>	50	9,8 ± 2,1	2,7 ± 0,4	3,8 ± 0,9	8,8 ± 2,8	1,0 ± 0,3	30	7,1 ± 1,2	2,5 ± 0,4	2,8 ± 0,6	6,0 ± 2,6	1,0 ± 0,4
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (♦)	50	10,2 ± 1,9	2,6 ± 0,4	3,9 ± 0,8	9,3 ± 2,2	1,0 ± 0,3	30	9,0 ± 2,1	2,8 ± 0,4	3,3 ± 0,9	8,6 ± 2,7	1,2 ± 0,4
<i>C. flexonema</i> (clone 7E)	50	8,7 ± 1,3	2,4 ± 0,3	3,7 ± 0,6	5,4 ± 1,6	1,1 ± 0,4	30	7,2 ± 1,3	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,5	3,2 ± 1,7	1,5 ± 0,5
<i>C. mellifica</i>	50	9,7 ± 1,6	2,7 ± 0,4	3,6 ± 0,5	9,1 ± 1,9	1,1 ± 0,3	30	8,8 ± 1,8	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,6	7,8 ± 1,8	1,1 ± 0,3
<i>C. hutneri</i>	50	9,0 ± 1,2	2,6 ± 0,3	3,5 ± 0,5	8,3 ± 1,9	1,3 ± 0,4	30	7,2 ± 1,2	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,4	5,9 ± 1,7	1,1 ± 0,3
<i>Crithidia</i> sp. (Z.I.) (clone 6G) (●)	50	8,7 ± 1,4	2,4 ± 0,3	3,7 ± 0,7	7,3 ± 1,8	1,0 ± 0,2	30	7,1 ± 1,0	2,3 ± 0,3	3,2 ± 0,6	5,5 ± 1,5	1,0 ± 0,2
<i>C. luciliae thermophila</i>	50	8,8 ± 1,2	2,6 ± 0,4	3,4 ± 0,4	9,2 ± 2,3	1,4 ± 0,4	30	6,7 ± 1,1	2,4 ± 0,3	2,8 ± 0,5	5,6 ± 2,6	1,0 ± 0,3
<i>C. harmosa</i>	50	7,2 ± 1,1	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,5	9,5 ± 2,4	1,0 ± 0,3	30	7,1 ± 1,0	2,6 ± 0,3	2,8 ± 0,4	9,0 ± 2,0	1,2 ± 0,3
<i>C. acanthocephali</i>	50	8,8 ± 1,2	2,4 ± 0,3	3,7 ± 0,6	9,4 ± 2,2	0,7 ± 0,3	30	7,8 ± 0,9	2,3 ± 0,3	3,4 ± 0,5	8,0 ± 2,1	1,4 ± 0,4
<i>W. inconstans</i> (clone 4C)	50	9,2 ± 1,4	2,5 ± 0,4	3,8 ± 0,8	8,1 ± 4,2	0,9 ± 0,3	30	7,5 ± 1,3	2,6 ± 0,4	3,0 ± 0,7	6,3 ± 2,5	1,0 ± 0,3
<i>W. brevicula</i> (clone 11E)	30	9,6 ± 1,1	2,6 ± 0,4	3,8 ± 0,7	7,2 ± 2,7	1,4 ± 0,4	30	8,1 ± 1,5	2,6 ± 0,4	3,1 ± 0,7	5,9 ± 1,9	1,2 ± 0,4
<i>A. deanei</i> (= "C." <i>deanei</i>) (★)	30	5,4 ± 0,5	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,4	4,8 ± 1,8	0,5 ± 0,2	30	5,1 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4	4,6 ± 1,5	0,5 ± 0,1
"C." <i>desouzai</i> (★)	30	7,2 ± 1,0	2,1 ± 0,2	3,5 ± 0,4	6,3 ± 1,7	0,8 ± 0,2	30	5,5 ± 0,9	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,5	4,5 ± 1,2	0,8 ± 0,2
"H." <i>roitmani</i> (clone 7E) (★)	30	6,3 ± 0,6	1,8 ± 0,3	3,5 ± 0,7	6,9 ± 1,6	0,9 ± 0,3	30	5,3 ± 0,6	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,4	5,1 ± 1,2	0,9 ± 0,2
"C." <i>oncopelti</i> (★)	30	8,5 ± 0,8	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4	8,9 ± 2,4	1,0 ± 0,3	30	7,9 ± 0,9	2,9 ± 0,4	2,7 ± 0,4	7,7 ± 1,8	1,4 ± 0,4

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) **índice nuclear** = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(§) isolados de insetos, com exceção de *Crithidia* sp. (C.t.) (♦) isolada de *Chamaesyce thymifolia*. (●) *Crithidia* sp. (Z.I.) isolada de *Zelus leucogrammus*. (★) amostras com endossimbionte.

TABELA XV

MORFOMETRIA DE CÉLULAS FLAGELADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS OU PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *HERPETOMONAS*

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C), exceto no caso das paramastigotas de *H. muscarum ingenoplastis* (48–144 h). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	promastigotas (cinetoplasto antenuclear)						paramastigotas (cinetoplasto paranuclear)					
	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>H. pessoai</i> (<i>H. samuelpeessoai</i>)	50	9,3 ± 1,6	2,6 ± 0,4	3,6 ± 0,8	10,6 ± 2,9	1,0 ± 0,3	30	7,6 ± 1,4	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,7	9,9 ± 3,3	1,0 ± 0,5
<i>H. anglusteri</i>	50	10,6 ± 1,7	2,5 ± 0,4	4,3 ± 0,7	12,4 ± 3,6	1,0 ± 0,3	30	8,5 ± 1,1	2,8 ± 0,4	3,1 ± 0,6	8,0 ± 2,3	0,7 ± 0,2
<i>H. mariadeanei</i>	50	12,9 ± 2,1	2,0 ± 0,2	6,7 ± 1,2	17,9 ± 3,8	1,7 ± 0,3	25	8,7 ± 2,3	2,3 ± 0,4	3,9 ± 1,3	14,4 ± 3,2	2,0 ± 0,9
<i>H. megaseliae</i>	50	13,8 ± 2,9	2,0 ± 0,2	6,9 ± 1,6	10,0 ± 2,6	1,7 ± 0,5	30	12,4 ± 2,3	2,3 ± 0,3	5,4 ± 1,1	8,5 ± 2,7	2,0 ± 0,6
<i>H. muscarum muscarum</i>	50	13,9 ± 2,7	1,9 ± 0,2	7,3 ± 1,6	12,8 ± 5,1	1,4 ± 0,3	30	10,3 ± 3,0	2,3 ± 0,3	4,6 ± 1,4	9,1 ± 3,8	1,3 ± 0,6
<i>H. m. ingenoplastis</i> (■) (a)	50	23,4 ± 3,1	2,2 ± 0,3	10,6 ± 1,7	28,3 ± 4,6	1,0 ± 0,2	30	14,1 ± 4,7	2,7 ± 0,5	5,3 ± 1,9	19,6 ± 8,5	1,6 ± 0,6
<i>H. m. ingenoplastis</i> (■) (b)	40	25,9 ± 3,2	2,4 ± 0,3	10,7 ± 1,7	29,2 ± 4,1	1,0 ± 0,1	---	---	---	---	---	---
<i>H. davidi</i> (◆)	50	13,2 ± 3,0	1,7 ± 0,4	7,9 ± 2,1	13,6 ± 5,0	1,6 ± 0,5	30	8,1 ± 1,5	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,7	6,3 ± 3,4	1,2 ± 0,4
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (◆)	50	11,5 ± 2,2	1,9 ± 0,2	6,2 ± 1,2	16,3 ± 5,7	1,0 ± 0,3	30	8,8 ± 1,4	2,1 ± 0,3	4,4 ± 0,8	11,0 ± 4,6	1,0 ± 0,5
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (◆)	50	14,5 ± 3,2	1,7 ± 0,3	8,7 ± 2,2	14,5 ± 5,6	1,5 ± 0,4	30	9,7 ± 2,4	2,3 ± 0,4	4,3 ± 1,2	7,8 ± 3,7	1,3 ± 0,4
<i>Herpetomonas</i> sp. (L.s.) (●)	50	16,0 ± 3,7	1,8 ± 0,3	9,1 ± 2,0	15,3 ± 6,2	1,5 ± 0,4	30	9,7 ± 1,5	2,2 ± 0,5	4,7 ± 1,3	8,1 ± 2,4	1,2 ± 0,3

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) **índice nuclear** = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(■) exigiu LIT 20% SFB). (a) células monoflageladas, (b) células biflageladas. (◆) isolados de plantas: *Herpetomonas* sp. (E.h.) de *Euphorbia hyssopifolia* e *Herpetomonas* sp. (S.l.) de *Solanum lycopersicum*. (●) *Herpetomonas* sp. (L.s.) isolada de *Leptoglossus stigma*.

TABELA XVI

MORFOMETRIA DE CÉLULAS FLAGELADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *LEPTOMONAS*

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	promastigotas (cinetoplasto antenuclear) (✕)						paramastigotas (cinetoplasto paranuclear)					
	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) (●)	50	13,1 ± 3,3	1,6 ± 0,3	8,2 ± 2,4	13,0 ± 4,4	1,6 ± 0,5	30	8,2 ± 1,5	1,8 ± 0,3	4,7 ± 0,9	8,5 ± 2,5	1,6 ± 0,4
<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) (●)	50	14,0 ± 2,7	1,5 ± 0,2	9,3 ± 2,1	13,2 ± 4,3	1,6 ± 0,3	30	9,7 ± 1,8	1,7 ± 0,3	5,9 ± 1,4	8,5 ± 2,8	1,5 ± 0,5
<i>L. pyrrocoris</i>	50	13,6 ± 2,2	1,8 ± 0,3	7,6 ± 1,6	15,9 ± 5,9	1,5 ± 0,4	30	9,5 ± 2,4	2,3 ± 0,4	4,2 ± 1,1	9,9 ± 3,2	1,5 ± 0,6
<i>L. seymouri</i>	50	12,5 ± 1,9	2,0 ± 0,3	6,4 ± 1,4	11,1 ± 3,4	1,3 ± 0,4	30	9,5 ± 1,0	2,2 ± 0,3	4,5 ± 0,7	8,8 ± 3,2	1,8 ± 0,4
<i>L. collosoma</i>	50	13,4 ± 2,7	2,4 ± 0,4	5,6 ± 1,1	13,5 ± 2,3	1,9 ± 0,4	30	9,7 ± 1,6	2,4 ± 0,4	4,1 ± 0,9	11,4 ± 2,8	1,9 ± 0,5
<i>L. costoris</i>	50	17,7 ± 3,3	3,3 ± 0,7	5,6 ± 1,2	17,0 ± 6,0	2,1 ± 0,6	30	17,3 ± 4,0	3,5 ± 0,5	5,0 ± 1,2	9,3 ± 6,5	2,5 ± 0,5
<i>L. samueli</i>	50	18,7 ± 3,0	2,2 ± 0,3	8,7 ± 1,8	19,4 ± 7,8	1,6 ± 0,3	30	11,8 ± 1,5	2,5 ± 0,3	4,8 ± 0,8	9,4 ± 4,9	1,7 ± 0,2
<i>L. lactosovorans</i>	50	12,0 ± 1,8	2,2 ± 0,3	5,4 ± 0,8	8,7 ± 4,2	1,1 ± 0,2	30	10,1 ± 1,0	2,5 ± 0,4	4,2 ± 0,8	6,6 ± 3,9	1,4 ± 0,2
<i>L. mirabilis</i> (■)	50	17,2 ± 3,4	2,8 ± 0,7	6,6 ± 2,8	10,1 ± 4,6	2,8 ± 0,8	30	17,3 ± 5,5	3,0 ± 0,6	6,0 ± 2,2	8,5 ± 3,9	4,1 ± 1,7
<i>L. pulexsimulantis</i> (◆)	50	12,9 ± 3,8	2,3 ± 0,6	6,0 ± 2,5	6,7 ± 3,8	1,8 ± 0,7	30	10,5 ± 2,1	2,8 ± 0,5	3,9 ± 1,0	4,6 ± 2,5	1,8 ± 0,5
<i>L. wallacei</i> (clone B) (◆)	50	13,7 ± 3,2	2,2 ± 0,4	6,2 ± 1,4	18,9 ± 6,0	1,1 ± 0,3	30	10,1 ± 2,0	2,6 ± 0,3	4,0 ± 1,1	17,9 ± 5,9	1,5 ± 0,4
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (●) (■) (◆)	50	16,2 ± 3,0	2,3 ± 0,6	7,4 ± 2,2	21,6 ± 5,8	1,3 ± 0,5	---	----	----	----	----	----

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) **índice nuclear** = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita. (✕) dados de promastigotas sem seleção do tipo.

(●) *Leptomonas* spp. isoladas de *Lutzomyia ayrozai* (L.a.-1 e L.a.-2, respectivamente, clones das amostras IM 3943 e IM 3944) e de *Oncopeltus varicolor* (O.v.). (■) exigiram LIT 20% SFB. (◆) amostras cistogênicas (os dados dos diferentes tipos de suas promastigotas estão apresentados na tabela XVII).

TABELA XVII

MORFOMETRIA DE DIFERENTES TIPOS DE PROMASTIGOTAS FLAGELADAS ENCONTRADOS EM *LEPTOMONAS* CISTOGÊNICAS

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	Tipos	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>L. pulexsimulantis</i>	1	50	14,0 ± 3,6	2,0 ± 0,4	7,3 ± 2,3	8,2 ± 3,8	1,9 ± 0,6
	2	30	11,3 ± 1,2	3,1 ± 0,6	3,7 ± 0,8	3,5 ± 2,0	1,8 ± 0,4
<i>L. wallacei</i> (clone B)	3	50	14,0 ± 3,5	2,2 ± 0,3	6,3 ± 1,5	19,0 ± 6,2	1,1 ± 0,3
	4	30	11,2 ± 2,1	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,8	20,5 ± 7,4	0,7 ± 0,2
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (■) (●)	3	50	16,9 ± 3,0	2,2 ± 0,4	8,0 ± 1,8	21,0 ± 5,8	1,5 ± 0,4
	4	30	13,4 ± 2,7	3,4 ± 0,5	4,1 ± 1,1	22,4 ± 4,0	0,5 ± 0,2

(**Tipo 1**) promastigotas frequentemente espiradas, finas e com flagelo maior que as do tipo 2. (**Tipo 2**) promastigotas menores, alargadas, não espiraladas e com flagelo curto. Ver Fig. 20. (**Tipo 3**) promastigotas comuns, às vezes com uma torção no corpo. (**Tipo 4**) promastigotas usualmente menores que as do tipo 3, com a porção posterior do corpo alargada e frequentemente arredondada (aspecto de raquete), onde geralmente ficava o núcleo. Ver Fig. 21.

(**N**) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (**C**) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (**L**) largura do corpo na porção mais larga, (**C/L**) razão comprimento/largura do corpo, (**F**) comprimento da porção livre do flagelo, (**IN**) **índice nuclear** = PN/NA , onde **PN** representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e **NA** a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(■) exigiu LIT 20% SFB. (●) *Leptomonas* sp. (O.v.) (amostra 36/429 TD) isolada de *Oncopeltus varicolor*.

TABELA XVIII

MORFOMETRIA DE CÉLULAS FLAGELADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE PLANTAS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *PHYTOMONAS*

Foram tomadas medidas de 50 células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	promastigotas (cinetoplasto antenuclear)				
	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>P. serpens</i> (isolado 9T)	13,9 ± 2,7	1,6 ± 0,3	9,0 ± 1,7	11,7 ± 6,6	2,0 ± 0,4
<i>Phytomonas</i> sp. (C.b.) (●)	10,5 ± 2,5	1,6 ± 0,3	6,8 ± 1,5	7,6 ± 4,4	1,4 ± 0,3
<i>P. macgheeii</i> (isolado 163 M, clone A)	15,4 ± 4,3	1,6 ± 0,2	10,0 ± 3,1	17,9 ± 9,4	1,7 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (A.c.) (●)	10,3 ± 1,9	1,4 ± 0,3	7,4 ± 1,5	8,1 ± 4,7	1,3 ± 0,2
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1) (●)	12,4 ± 2,9	1,7 ± 0,3	7,3 ± 1,6	12,3 ± 5,9	1,4 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2) (●) (■)	21,9 ± 6,6	1,8 ± 0,4	12,0 ± 3,1	25,6 ± 15,9	1,7 ± 0,5
<i>P. francai</i> (■)	16,8 ± 3,0	2,3 ± 0,5	7,5 ± 1,5	12,9 ± 5,2	1,9 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) (●)	12,8 ± 2,0	2,1 ± 0,4	6,4 ± 1,5	12,2 ± 6,0	2,7 ± 0,6

Parâmetros biométricos: (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(●) *Phytomonas* spp. isoladas de *Citrus bergamia* (C.b.), *Allamanda cathartica* (A.c.), *Euphorbia pinea* (E.p.), *Euphorbia characias* (E.c.) e *Jatropha macrantha* (J.m.). (■) exigiram LIT 20% SFB.

TABELA XIX

MORFOMETRIA DE CÉLULAS SEM FLAGELO LIVRE ENCONTRADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS QUE APRESENTAM A FORMA COANOMASTIGOTA (S) E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Foram tomadas medidas de 30 células coradas pelo Giemsa {exceto em *C. hamosa* com cinetoplasto antenuclear (N= 8) e "*C.*" *oncopelti* (N= 12)} procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	procoanomastigotas (cinetoplasto antenuclear)				paracoanomastigotas (cinetoplasto paranuclear)			
	C (µm)	L (µm)	C/L	IN	C (µm)	L (µm)	C/L	IN
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Anopheles</i>) (★)	6,4 ± 1,1	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2	6,2 ± 0,9	2,8 ± 0,8	2,3 ± 0,7	0,6 ± 0,2
<i>C. fasciculata</i> (cepa <i>Culex</i>) (★)	5,8 ± 1,0	2,9 ± 0,6	2,0 ± 0,4	0,4 ± 0,2	5,2 ± 0,9	2,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0,4 ± 0,1
<i>C. guilhermei</i> (★)	5,9 ± 0,8	2,8 ± 0,6	2,1 ± 0,4	0,4 ± 0,2	5,4 ± 0,9	2,9 ± 0,5	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,3
<i>C. luciliae</i> (★)	5,6 ± 1,0	2,4 ± 0,6	2,4 ± 0,6	0,5 ± 0,3	5,2 ± 0,6	2,4 ± 0,4	2,2 ± 0,4	0,5 ± 0,2
<i>C. ricardoii</i> (★)	6,2 ± 1,1	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,5 ± 0,2	6,0 ± 1,0	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	0,7 ± 0,2
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (★) (◆)	6,2 ± 1,1	2,9 ± 0,5	2,2 ± 0,5	0,3 ± 0,2	5,7 ± 0,7	2,9 ± 0,5	2,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1
<i>C. flexonema</i> (clone 7E) (★)	5,9 ± 1,0	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,6	0,5 ± 0,2	4,9 ± 0,8	2,7 ± 0,6	1,9 ± 0,5	0,7 ± 0,4
<i>C. mellificae</i> (★)	6,6 ± 2,0	3,1 ± 0,6	2,3 ± 0,9	0,5 ± 0,3	7,3 ± 2,0	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,9	0,8 ± 0,3
<i>C. hutneri</i> (★)	6,6 ± 1,5	2,7 ± 0,6	2,5 ± 0,6	0,4 ± 0,2	5,9 ± 0,7	2,4 ± 0,5	2,6 ± 0,6	0,5 ± 0,2
<i>Crithidia</i> sp. (Z.l.) (clone 6G) (★) (●)	7,2 ± 1,3	3,0 ± 0,8	2,5 ± 0,7	0,4 ± 0,3	6,5 ± 1,1	2,8 ± 0,6	2,4 ± 0,7	0,5 ± 0,3
<i>C. luciliae thermophila</i>	---	---	---	---	5,2 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,5	0,5 ± 0,2
<i>C. hamosa</i> (★)	5,9 ± 1,4	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,8	0,7 ± 0,3	5,9 ± 1,1	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,8	0,7 ± 0,2
<i>C. acanthocephali</i>	---	---	---	---	6,6 ± 1,1	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,5	0,7 ± 0,3
<i>W. incontans</i> (clone 4C) (★)	6,1 ± 1,2	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,7	0,4 ± 0,2	5,5 ± 0,8	2,4 ± 0,6	2,4 ± 0,6	0,4 ± 0,1
<i>W. brevicula</i> (clone 11E) (★)	6,2 ± 0,9	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	6,0 ± 0,8	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2
<i>A. deanei</i> (= " <i>C.</i> " <i>deanei</i>) (★)	---	---	---	---	4,8 ± 0,5	2,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1
" <i>C.</i> " <i>desouzai</i> (★)	---	---	---	---	5,1 ± 0,7	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,4	0,7 ± 0,2
" <i>H.</i> " <i>roitmani</i> (clone 7E) (★)	---	---	---	---	4,7 ± 0,6	2,6 ± 0,3	1,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1
" <i>C.</i> " <i>oncopelti</i> (★)	---	---	---	---	8,7 ± 1,0	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4	1,3 ± 0,3

Parâmetros biométricos: (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (IN) índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(S) isolados de insetos, com exceção de *Crithidia* sp. (C.t.) (◆) isolada de *Chamaesyce thymifolia*. (★) apresentam coanomastigotas aflageladas peculiares, que ocorrem isoladas, aos pares ou em grupos de mais células (haptomonas). (●) *Crithidia* sp. (Z.l.) isolada de *Zelus leucogrammus*. (★) amostras com endossimbionte.

TABELA XX

MORFOMETRIA DE CÉLULAS SEM FLAGELO LIVRE ENCONTRADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS E CLASSIFICADOS NO GÊNERO *LEPTOMONAS*

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C), exceto no caso das formas com cinetoplasto paranuclear de *L. wallacei* (96 h). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	promastigotas (cinetoplasto antenuclear)					paramastigotas (cinetoplasto paranuclear)				
	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	IN	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	IN
<i>L. costoris</i>	30	17,9 ± 5,0	3,4 ± 0,9	5,4 ± 1,2	2,0 ± 0,7	30	17,1 ± 3,5	3,6 ± 0,6	4,9 ± 1,4	2,4 ± 0,5
<i>L. samueli</i>	30	12,4 ± 2,6	2,3 ± 0,4	5,5 ± 1,2	1,4 ± 0,4	---	---	---	---	---
<i>L. lactosovorans</i>	30	11,3 ± 1,9	2,3 ± 0,4	5,1 ± 1,2	1,2 ± 0,3	30	10,1 ± 1,4	2,3 ± 0,4	4,6 ± 1,3	1,3 ± 0,3
<i>L. mirabilis</i> (■)	30	18,1 ± 4,0	2,5 ± 0,6	7,5 ± 2,3	3,2 ± 1,3	10	17,4 ± 3,9	2,6 ± 0,5	7,2 ± 3,1	4,4 ± 1,6
<i>L. pulexsimulantis</i>	30	10,7 ± 1,6	3,0 ± 0,7	3,8 ± 1,0	1,5 ± 0,4	30	10,5 ± 1,8	2,9 ± 0,5	3,7 ± 0,9	1,6 ± 0,4
<i>L. wallacei</i> (clone B)	30	13,7 ± 3,3	2,2 ± 0,5	6,4 ± 1,8	1,4 ± 0,4	30	11,1 ± 3,1	2,4 ± 0,4	4,8 ± 1,6	1,5 ± 0,5
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (■) (●)	30	15,4 ± 3,3	2,2 ± 0,3	7,0 ± 1,4	1,5 ± 0,3	---	---	---	---	---

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (IN) índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(■) exigiram LIT 20 % SFB. (●) *Leptomonas* sp. (O.v.) (amostra 36/429 TD) isolada de *Oncopeltus varicolor*.

TABELA XXI

**MORFOMETRIA DE CÉLULAS SEM FLAGELO LIVRE ENCONTRADAS
EM TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE PLANTAS E
CLASSIFICADOS NO GÊNERO *PHYTOMONAS***

Foram tomadas medidas de 30 células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas com 72 h em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	promastigotas (cinetoplasto antenuclear)			
	C (µm)	L (µm)	C/L	IN
<i>P. serpens</i> (isolado 9T)	11,3 ± 2,3	1,6 ± 0,3	7,1 ± 1,0	1,8 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (C.b.) (◆)	8,8 ± 1,3	1,6 ± 0,3	5,8 ± 1,1	1,3 ± 0,2
<i>P. macgheeii</i> (isolado 163 M, clone A)	11,3 ± 2,8	1,7 ± 0,2	6,7 ± 1,3	1,7 ± 0,4
<i>Phytomonas</i> sp. (A.c.) (◆)	7,7 ± 1,5	1,3 ± 0,3	6,1 ± 1,8	1,3 ± 0,4
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1) (◆)	10,1 ± 2,2	1,6 ± 0,3	6,4 ± 1,8	1,5 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2) (◆) (■)	15,5 ± 5,9	2,0 ± 0,4	7,9 ± 2,2	1,7 ± 0,5
<i>P. francai</i> (■)	12,9 ± 3,3	1,8 ± 0,4	7,2 ± 2,1	1,6 ± 0,3
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) (◆)	10,9 ± 1,2	1,9 ± 0,4	6,1 ± 1,8	2,1 ± 0,5

Parâmetros biométricos: (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (IN) índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(◆) *Phytomonas* spp. isoladas de *Citrus bergamia* (C.b.), *Allamanda cathartica* (A.c.), *Euphorbia pinea* (E.p.), *Euphorbia characias* (E.c.) e *Jathropha macrantha* (J.m.). (■) exigiram LIT 20% SFB.

TABELA XXII

MORFOMETRIA DE "CISTOS" FLAGELARES ENCONTRADOS EM
TRIPANOSOMATÍDEOS CLASSIFICADOS NO GÊNERO *LEPTOMONAS*

Foram tomadas medidas de "cistos" flagelares (livres ou aderidos à célula mãe) corados pelo Giemsa e procedentes de esfregaços de culturas em diferentes meios (~27,3°C) com 72 h, exceto no caso da *L. wallacei* (♣). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	Meios de cultura	Posição do cinetoplasto	N=	C (μm)	L (μm)	C/L	IN
<i>L. pulexsimulantis</i>	LIT	paranuclear	30	3,7 ± 0,7	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,4	0,4 ± 0,1
<i>L. wallacei</i> (original) (♣)	MWM	antenuclear	30	6,5 ± 1,7	1,8 ± 0,3	3,7 ± 0,9	1,1 ± 0,5
<i>L. wallacei</i> (original) (♣)	MWM	paranuclear	30	3,9 ± 1,8	1,4 ± 0,2	2,9 ± 1,2	0,7 ± 0,6
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (●)	LIT 20% SFB	antenuclear	11	6,3 ± 1,4	1,7 ± 0,3	3,7 ± 0,8	1,2 ± 0,4

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (IN) **índice nuclear** = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(♣) cultura em fase de crescimento exponencial, sem determinação do número de horas. (MWM) meio de Warren modificado. (●) *Leptomonas* sp. (O.v.) (amostra 36/429 TD) isolada de *Oncopeltus varicolor*.

TABELA XXIII

MORFOMETRIA DE CÉLULAS COM CINETOPLASTO POSNUCLEAR^(a, b) (COM OU SEM FLAGELO LIVRE) ENCONTRADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C). Medidas em micrômetros, dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	Horas de cultivo	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>C. luciliae</i> (a)	72-120	30	6,9 ± 1,1	2,0 ± 0,3	3,6 ± 0,9	8,4 ± 4,8	0,9 ± 0,3
<i>C. ricardoii</i> (a)	72-120	30	5,2 ± 0,6	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,5	1,4 ± 1,6	0,9 ± 0,3
<i>C. flexonema</i> (clone 7E) (a)	96-144	30	5,0 ± 0,7	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,6	1,4 ± 0,7	0,8 ± 0,2
<i>C. mellificae</i> (a)	120-144	12	5,5 ± 0,8	2,5 ± 0,4	2,3 ± 0,5	4,3 ± 1,0	1,0 ± 0,2
<i>C. hamosa</i> (a)	72-120	20	5,3 ± 0,7	2,0 ± 0,4	2,8 ± 0,8	3,0 ± 1,7	1,0 ± 0,3
<i>C. acanthocephali</i>	120-144	12	5,7 ± 0,7	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3	0,9 ± 0,7	0,9 ± 0,2
<i>W. inconstans</i> (clone 4C) (a)	120-144	30	5,5 ± 0,8	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,5	3,3 ± 2,2	0,9 ± 0,2
<i>W. brevicula</i> (clone 11E) (a)	72-120	30	5,8 ± 0,7	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,9 ± 2,3	0,7 ± 0,2
<i>A. deanei</i> (= " <i>C.</i> " <i>deanei</i>) (a) (★)	72-120	30	4,6 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,6	1,1 ± 1,5	0,9 ± 0,3
" <i>C.</i> " <i>desouzai</i> (a) (★)	72-120	30	4,5 ± 0,7	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,5	1,3 ± 1,0	1,0 ± 0,3
" <i>H.</i> " <i>roitmani</i> (clone 7E) (a) (★)	72-120	30	4,7 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,5 ± 0,5	1,1 ± 1,3	0,9 ± 0,3
" <i>C.</i> " <i>oncopelti</i> (a) (★)	72-120	30	5,8 ± 1,3	2,8 ± 0,3	2,1 ± 0,5	4,6 ± 2,7	1,4 ± 0,4
<i>H. pessoai</i> (= <i>H. samuelpessoai</i>) (b)	72-120	30	6,6 ± 1,3	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,7	7,0 ± 3,0	0,8 ± 0,2
<i>H. anglusteri</i> (b)	72-120	30	7,6 ± 1,3	3,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6	6,6 ± 1,6	0,6 ± 0,2
<i>H. mariadeanei</i> (b)	72-120	30	8,6 ± 1,4	2,0 ± 0,3	4,4 ± 1,0	1,2 ± 1,4	1,6 ± 0,8
<i>H. megaseliae</i> (b)	72-120	30	12,6 ± 1,9	2,0 ± 0,2	6,5 ± 1,2	3,6 ± 2,2	1,1 ± 0,2
<i>H. muscarum muscarum</i> (b)	72-120	30	11,4 ± 1,9	2,2 ± 0,3	5,2 ± 1,1	5,7 ± 2,9	0,7 ± 0,2
<i>H. m. ingenoplastis</i> (b) (■)	48-72	8	11,5 ± 2,0	2,9 ± 0,6	4,1 ± 1,0	17,3 ± 7,6	1,4 ± 0,5
<i>H. davidi</i> (b)	72-120	30	6,4 ± 1,0	2,5 ± 0,5	2,6 ± 0,7	4,5 ± 2,4	1,0 ± 0,3
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (b) (◆)	72-120	30	8,7 ± 1,1	2,1 ± 0,3	4,3 ± 0,8	6,9 ± 2,5	0,6 ± 0,1
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (b) (◆)	96-144	23	9,5 ± 1,9	2,4 ± 0,6	4,1 ± 1,3	6,2 ± 2,5	1,2 ± 0,5
<i>L. samueli</i> (b)	96-144	30	11,0 ± 1,3	2,1 ± 0,3	5,5 ± 1,0	1,9 ± 1,4	1,2 ± 0,3
<i>L. lactosovorans</i> (b)	120-144	30	7,8 ± 0,7	2,0 ± 0,3	3,9 ± 0,7	0,8 ± 0,9	0,9 ± 0,2
<i>L. mirabilis</i> (b) (■)	72-120	10	10,9 ± 2,9	2,7 ± 0,4	4,1 ± 1,3	10,0 ± 4,2	2,5 ± 0,9
<i>L. pulexsimulantis</i> (b)	72-120	30	7,6 ± 1,7	2,9 ± 0,5	2,7 ± 0,6	3,0 ± 1,7	1,6 ± 0,5

Formas: (a) metacoanomastigota, (b) opistomastigota. (N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(★) amostras com endossimbionte. (■) exigiram LIT 20% SFB. (◆) *Herpetomonas* sp. (E.h.) isolada de *Euphorbia hyssopifolia* e *Phytomonas* sp. (S.l.) isolada de *Solanum lycopersicum*.

TABELA XXIV

MORFOMETRIA DE ENDOMASTIGOTAS E ENDOCOANOMASTIGOTAS (COM OU SEM FLAGELO LIVRE) ENCONTRADAS EM TRIPANOSOMATÍDEOS CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas em LIT básico (~27,3°C). Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	(Endos) tipo 1							(Endos) tipo 2						
	Horas de cultivo	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	Horas de cultivo	N=	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>C. luciliae</i> (a)	72	30	9,3 ± 1,3	2,3 ± 0,2	4,1 ± 0,6	7,5 ± 4,3	0,8 ± 0,2	72	20	7,4 ± 1,9	2,4 ± 0,4	3,2 ± 1,1	1,0 ± 0,9	0,8 ± 0,3
<i>C. ricardoii</i> (a)	72	30	6,3 ± 1,6	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,8	1,7 ± 2,1	0,5 ± 0,3	72	30	5,2 ± 0,7	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	0,3 ± 0,6	0,6 ± 0,2
<i>Crithidia</i> sp. (C.t.) (original) (a) (♦)	---	---	---	---	---	---	---	72 e 144	20	5,0 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,4	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,2
<i>C. flexonema</i> (clone 7E) (a)	96-144	30	5,4 ± 0,9	2,2 ± 0,5	2,5 ± 0,7	1,1 ± 1,3	0,4 ± 0,2	---	---	---	---	---	---	---
<i>C. mellificae</i> (a)	96	10	5,6 ± 1,0	3,0 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,5 ± 1,3	0,4 ± 0,2	144	12	5,2 ± 0,6	2,7 ± 0,4	2,0 ± 0,3	0,5 ± 0,6	0,8 ± 0,2
<i>C. hutneri</i> (a)	72	30	7,4 ± 1,3	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,5	3,7 ± 2,0	0,7 ± 0,2	---	---	---	---	---	---	---
<i>Crithidia</i> sp. (Z.l.) (clone 6G) (a) (●)	72-120	30	7,3 ± 1,4	2,4 ± 0,3	3,0 ± 0,5	5,1 ± 2,4	0,9 ± 0,2	144	20	5,7 ± 0,8	2,5 ± 0,4	2,3 ± 0,4	0,3 ± 0,5	0,6 ± 0,2
<i>C. luciliae thermophila</i> (a)	96-144	30	5,5 ± 0,6	2,6 ± 0,4	2,1 ± 0,4	0,3 ± 0,7	0,4 ± 0,1	---	---	---	---	---	---	---
<i>C. harmonosa</i> (a)	72	30	6,5 ± 1,0	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,4	4,5 ± 2,7	0,7 ± 0,3	72-120	30	5,7 ± 0,7	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,6	2,1 ± 1,7	0,8 ± 0,3
<i>W. inconstans</i> (clone 4C) (a)	72	30	7,2 ± 1,1	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,5	3,5 ± 2,7	0,8 ± 0,2	72	30	6,0 ± 0,7	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,4	0,2 ± 0,6	0,8 ± 0,2
<i>W. brevicula</i> (clone 11E) (a)	72	30	7,2 ± 1,4	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,5	1,3 ± 1,4	0,7 ± 0,2	72	30	7,0 ± 0,6	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,2 ± 0,6	0,9 ± 0,2
<i>A. deanei</i> (= "C." <i>deanei</i>) (a) (★)	120	20	5,9 ± 0,7	2,6 ± 0,3	2,3 ± 0,5	3,4 ± 2,2	0,5 ± 0,2	---	---	---	---	---	---	---
"C." <i>desouzai</i> (a) (★)	72 e 144	20	5,6 ± 0,5	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,6	1,7 ± 1,0	0,7 ± 0,1	---	---	---	---	---	---	---
"H." <i>roitmani</i> (clone 7E) (a) (★)	72	20	5,0 ± 0,6	2,6 ± 0,3	2,0 ± 0,3	0,4 ± 0,7	0,6 ± 0,1	72	12	5,1 ± 0,6	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,3	---	0,7 ± 0,1
<i>H. pessoai</i> (<i>H. samuelpessoai</i>) (b)	72	30	8,0 ± 1,5	3,3 ± 0,4	2,5 ± 0,5	9,3 ± 2,9	0,8 ± 0,4	---	---	---	---	---	---	---
<i>H. anglusteri</i> (b)	72	30	10,3 ± 2,3	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,8	5,6 ± 3,0	0,7 ± 0,3	---	---	---	---	---	---	---
<i>H. mariadeanei</i> (b)	72-120	30	7,9 ± 1,8	2,3 ± 0,4	3,6 ± 0,8	3,2 ± 4,6	1,0 ± 0,5	72-120	20	7,7 ± 1,1	2,2 ± 0,3	3,5 ± 0,6	0,1 ± 0,2	0,8 ± 0,4
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (b) (♦)	72	30	8,3 ± 2,0	2,3 ± 0,3	3,6 ± 0,9	6,4 ± 3,4	0,8 ± 0,3	72	30	7,7 ± 0,8	2,4 ± 0,4	3,4 ± 0,7	3,7 ± 1,3	0,9 ± 0,3

Formas: (a) endocoanomastigota, (b) endomastigota. **(Endos)** endomastigotas ou endocoanomastigotas: **tipo 1:** o flagelo não contorna o núcleo, **tipo 2:** o flagelo contorna o núcleo. **(N)** número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** **(C)** comprimento do corpo sem o flagelo livre, **(L)** largura do corpo na porção mais larga, **(C/L)** razão comprimento/largura do corpo, **(F)** comprimento da porção livre do flagelo, **(IN)** índice nuclear = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(♦) Isolados de plantas: *Crithidia* sp. (C.t.) de *Chamaesyce thymifolia* e *Herpetomonas* sp. (E.h.) de *Euphorbia hyssopifolia*. (●) *Crithidia* sp. (Z.l.) isolada de *Zelus leucogrammus*. (★) amostras com endossimbionte.

TABELA XXV

VARIABILIDADE MORFOMÉTRICA DURANTE O CULTIVO: TRIPANOSOMATÍDEOS CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS
Foram tomadas medidas de células coradas pelo Giemsa procedentes de esfregaços de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C) em diferentes horas. Medidas em micrômetros; dados expressam a média e o desvio padrão.

Amostras	formas flageladas (cinetoplasto antenuclear)					formas flageladas (cinetoplasto paranuclear)					formas flageladas ou não (cinetoplasto posnuclear)				
	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN	C (µm)	L (µm)	C/L	F (µm)	IN
<i>"H."</i> <i>dedonderi</i> (*)															
48 h (N= 30; 30)	12,5 ± 1,7	1,8 ± 0,3	7,2 ± 1,3	10,1 ± 2,2	1,3 ± 0,3	9,8 ± 1,8	2,1 ± 0,3	4,8 ± 1,0	7,2 ± 3,1	1,8 ± 0,6	---	---	---	---	---
72 h (N= 50; 30; 30)	11,2 ± 2,0	2,6 ± 0,4	4,4 ± 1,0	7,3 ± 2,5	1,0 ± 0,3	8,2 ± 1,8	2,9 ± 0,6	2,9 ± 0,8	5,8 ± 2,6	1,2 ± 0,6	7,3 ± 1,1	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,6	2,8 ± 2,0	1,4 ± 0,6
120 h (N= 30; 30; 30)	9,1 ± 1,8	3,0 ± 0,6	3,2 ± 1,2	9,1 ± 1,9	1,0 ± 0,4	7,5 ± 1,5	3,2 ± 0,6	2,5 ± 0,8	7,6 ± 2,1	1,2 ± 0,4	6,0 ± 0,8	3,4 ± 0,7	1,8 ± 0,4	3,6 ± 2,4	1,2 ± 0,5
<i>L. wallacei</i> (clone B)															
72 h (N= 50; 30) (*)	13,7 ± 3,2	2,2 ± 0,4	6,2 ± 1,4	18,9 ± 6,0	1,1 ± 0,3	10,1 ± 2,0	2,6 ± 0,3	4,0 ± 1,1	17,9 ± 5,9	1,5 ± 0,4	---	---	---	---	---
96 h (N= 30; 30) (*)	12,3 ± 3,6	2,8 ± 0,6	4,7 ± 2,2	19,7 ± 7,9	0,8 ± 0,3	7,8 ± 1,5	3,2 ± 0,4	2,5 ± 0,6	16,4 ± 8,5	1,0 ± 0,3	---	---	---	---	---
<i>Phytomonas francai</i> (■)															
72 h (N= 50)	16,8 ± 3,0	2,3 ± 0,5	7,5 ± 1,5	12,9 ± 5,2	1,9 ± 0,3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
120 h (N= 30) (*)	12,1 ± 3,7	2,6 ± 0,9	5,5 ± 2,8	11,2 ± 4,3	1,6 ± 0,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
120 h (N= 30) (⊙)	9,6 ± 2,0	3,8 ± 0,6	2,6 ± 0,6	11,8 ± 4,4	1,5 ± 0,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.) (◆)															
72 h (N= 50)	12,8 ± 2,0	2,1 ± 0,4	6,4 ± 1,5	12,2 ± 6,0	2,7 ± 0,6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
120 h (N= 30) (*)	11,8 ± 3,4	2,3 ± 0,8	5,7 ± 2,4	12,5 ± 6,5	2,1 ± 0,6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
120 h (N= 30) (⊙)	7,7 ± 1,2	3,8 ± 0,6	2,1 ± 0,5	14,7 ± 6,7	1,6 ± 0,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (◆)															
72 h (N= 50)	12,4 ± 2,9	1,7 ± 0,3	7,3 ± 1,6	12,3 ± 5,9	1,4 ± 0,3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
120 h (N= 30)	16,2 ± 3,7	1,6 ± 0,2	10,1 ± 2,0	16,0 ± 7,1	1,7 ± 0,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(N) número de células medidas. **Parâmetros biométricos:** (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre, (L) largura do corpo na porção mais larga, (C/L) razão comprimento/largura do corpo, (F) comprimento da porção livre do flagelo, (IN) **índice nuclear** = PN/NA, onde PN representa a distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo e NA a distância do meio do núcleo à extremidade anterior do parasita.

(*) amostra original. (*) dados de promastigotas sem selecionar o tipo. (⊙) dados de promastigotas alargadas, algumas aparentemente com parte do flagelo aderido ao corpo. (■) exigiu LIT 20% SFB. (◆) *Phytomonas* sp. (J.m.) isolada de *Jathropa macrantha* e *Phytomonas* sp. (E.p.) isolada de *Euphorbia pinea* (amostra EM1).

3.5. Fenômenos sugestivos de sexualidade em tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e classificados em diferentes gêneros

No presente estudo, em várias espécies classificadas em diferentes gêneros (Tabela XXVI), encontramos **2 tipos de pares peculiares** de células unidas pelas extremidades posteriores, como definidos no item 2.8 (pares **tipo 1**: Figs 25–28, setas pequenas; **pares tipo 2**: Figs 26–28, ☆). Também encontramos formas diferenciadas que se assemelhavam a um "sino", "jarro" (Figs 25–28, ★) ou "chupeta" (Fig. 27 B, C, ►). Tais pares e formas já haviam sido descritos (ver Anexos 7.1.1, 7.1.3–7.1.5), sugerindo etapas de processos de sexualidade, com a possibilidade de transferência de núcleo de uma célula a outra e, às vezes, sua fusão (Figs 25–28, *, *). Nestas figuras, as setas pequenas apontam a "linha" que cora pelo Giemsa na região de contato entre as células nos pares **tipo 1**.

Nas espécies de *Crithidia*, só foram encontrados pares do **tipo 1** (Fig. 25, setas pequenas) em taxas $\leq 0,2\%$. Em alguns destes pares, observou-se a possibilidade de migração de núcleos (Fig. 25, *) e, às vezes, sua aparente fusão (Fig. 25 C, *) (Tabela XXVI). Em diversas espécies, foram encontradas células semelhantes a um "sino" ou "jarro" (Figs 5–8, 9 A, B, 10 A, 25, ★) em taxas que variaram entre 0,2% (*C. guilhermei*) e 8,9% [*C. fasciculata* (cepa *Culex*)] (Tabela VI, "outros").

Na maioria das espécies classificadas como *Herpetomonas* (exceções, *H. anglusteri* e *H. muscarum ingenoplastis*) ocorreram tanto pares do **tipo 1** (Fig. 26, 27, setas menores), em taxas que variaram entre 0,2% [*Herpetomonas* sp. (L.s.)] e 2,6% [*Herpetomonas* sp. (E.h.)], quanto do **tipo 2** (Fig. 26, 27 A, C, ☆), estes em taxas de 0,04% (*H. pessoai*) a 0,5% [*Herpetomonas* sp. (S.I.)] (Tabela XXVI). Também foram observados pares do **tipo 1** constituídos por paramastigotas (Fig. 26 A, seta grande), opistomastigotas (Figs. 26 B, 27 A, ▷) ou endomastigotas (Fig. 26 D, ►). Em alguns destes pares parecia ter ocorrido migração de núcleos (Figs 26 A–C, 27, *) e sua aparente fusão (Figs 26 A, C, D, 27 A, C, *). Nestas espécies de *Herpetomonas*, também encontramos células tipo "sino" ou "jarro" com um ou dois núcleos (Figs 26, 27, ★) e, mais raramente, anucleadas, além de células semelhantes a uma "chupeta" (Fig. 27 B, C, ►), em taxas que variaram entre 0,1% (*H. megaseliae*) e 1,6% [*Herpetomonas* sp. (E.h.)] (Tabela VII, "outros"). Em *H. mariadeanei*, também foram vistos pares de células apostas com formato arredondado e tendo os núcleos próximos ou aparentemente fundidos (Fig. 26 D, ●), tal como vistos anteriormente em *H. davidi* (anexo 7.1.3). No estudo atual, *H. davidi* não apresentou o fenômeno tão exacerbado quanto na descrição original, quando foi chamada de *P. davidi*.

Em algumas espécies classificadas como *Leptomonas* ou *Phytomonas* encontramos pares de células apostas, em geral do **tipo 1**, em taxas que variaram entre 0,04% [*Phytomonas* sp. (J.m.)] e 22,0% (*L. pyrrocoris*) (Tabela XXVI; Fig. 28). Em algumas destas amostras, também foram

observados eventos sugestivos de migração e fusão de núcleos (Tabela XXVI; Fig. 28 A, C, indicadas por *, *). Apenas em *L. collosoma* e *Phytomonas* sp. (E.c.), foram encontradas células do tipo "sino" ou "jarro" (Fig. 18 C, ★; Tabelas VIII, IX, "outros" e "outros 1", respectivamente). Em *Phytomonas* sp. (E.c.), também foram vistas mais de duas células unidas pelas extremidades posteriores e com uma "linha" corada pelo Giemsa na região de contato (Fig. 28 E, note a posição do núcleo em uma das células). Em *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.), certas células com a extremidade posterior diferenciada, às vezes com forma de "raquete" (Fig. 28 B, C, ►) pareciam ter correlação com alguns dos pares vistos nestas espécies (Fig. 28 B, cabeça de seta). Nas Figs 27 C e 28 A, D (setas maiores) estão ilustradas células em processo de divisão binária longitudinal para comparação com os pares peculiares aqui descritos.

Em algumas espécies classificadas em diferentes gêneros, também encontramos taxas relativamente altas de células anucleadas, mas com cinetoplasto e flagelo. Estas podiam ser vistas livres nas culturas (Fig. 26 A, 27 C, 28 C, cabeças de seta pequenas) ou ligadas a uma outra célula com a qual fazia par (25 B, C, 26, 27 A, C, 28 C, *, *), podendo ser alongadas ou semelhantes a um "sino" ou "jarro". Nas amostras em que fenômenos sugestivos de transferência de núcleo de uma célula para a outra foram observados, é possível que as formas anucleadas livres tenham derivado da sua separação de um par (Figs 25 B, C, 26, 27 A, C, 28 C, *, *). Contudo, nas espécies em que estes fenômenos não foram encontrados, mas as divisões anômalas eram mais freqüentes, como em *L. costoris* (2,2%), é possível que células anucleadas se originassem de tais divisões. Por outro lado, ressaltamos que em nossos estudos, divisões anômalas raramente foram vistas ou ocorreram em taxas < 0,1%; *L. costoris* foi uma exceção marcante. Na Tabela XXVI, os percentuais de formas anucleadas referem-se apenas às livres.

Além das amostras assinaladas com (◇) na Tabela XXVI, em outras espécies incluídas neste estudo, como *L. seymouri* e *L. mirabilis*, foram também observados diversos pares de promastigotas (ou mesmo de promastigotas e paramastigotas) cuja região de contato era pequena e sem a "linha" ou "anel" corado pelo Giemsa. Em *L. mirabilis*, tais pares foram freqüentes e diversos deles eram compostos por células de estágios diferentes (Fig. 19 C, ★). Ressaltamos que estes pares podiam, de fato, representar a fase final de um processo de divisão, mas, em algumas espécies de tripanosomatídeos, conforme descrevemos e ilustramos (Figs 25–28), também podiam ser o início de uma fusão celular (Figs 29 A, 30 A).

TABELA XXVI

FENÔMENOS SUGESTIVOS DE SEXUALIDADE EM TRIPANOSOMATÍDEOS DE INSETOS OU PLANTAS E CLASSIFICADOS EM DIFERENTES GÊNEROS

Os percentuais de pares peculiares (tipo 1 ou 2) e de células anucleadas foram determinados após exame de pelo menos 2.500 células {exceto em *L. costoris* (N= 1.737) e *Phytomonas* sp. (E.c.) (N= 1.520)} selecionadas ao acaso entre 48–144h h em esfregaços corados pelo Giemsa procedentes de culturas em LIT básico ou LIT 20% SFB (~27,3°C).

Amostras	Percentuais			Eventos sugestivos de transferência ou fusão de núcleos
	pares tipo 1	pares tipo 2	células anucleadas \diamond	
<i>C. fasciculata</i> (Cepa <i>Culex</i>) (\triangle)	0,1	---	---	(*)
<i>C. guilhermei</i> (\triangle)	0,2	---	---	(*)
<i>C. flexonema</i> (clone 7E) (\triangle)	0,1	---	0,9	(*)
<i>C. mellificae</i> (\triangle)	0,04	---	0,04	N
<i>C. hutneri</i> (\triangle)	0,07	---	---	(*)
<i>C. luciliae thermophila</i> (\triangle)	0,04	---	0,04	N
<i>C. hamosa</i> (\triangle)	0,1	---	0,03	(*)
<i>H. pessoai</i> (= <i>H. samuelpeessoai</i>) (\triangle)	0,3	0,04	4,2	(*)
<i>H. megaseliae</i> (\triangle) (\diamond)	2,2	0,07	0,8	(*)
<i>H. muscarum muscarum</i> (\triangle) (\diamond)	1,2	0,2	0,3	(*)
<i>H. mariadeanei</i> (\triangle) (\diamond)	1,4	0,1	2,2	(*)
<i>H. davidi</i> (\triangle) (\diamond)	1,1	0,2	1,0	(*)
<i>Herpetomonas</i> sp. (E.h.) (\triangle) (\diamond) (\blacklozenge)	2,6	0,4	1,4	(*)
<i>Herpetomonas</i> sp. (S.l.) (\triangle) (\diamond) (\blacklozenge)	0,5	0,5	0,4	(*)
<i>Herpetomonas</i> sp. (L.s.) (\triangle) (\diamond) (\bullet)	0,2	0,3	0,9	(*)
<i>L. pyrrhocoris</i> (\diamond)	22,0	---	0,6	(*)
<i>L. wallacei</i> (clone B) (\diamond)	0,3	---	0,3	(*)
<i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) (isolado 36/429 TD) (\triangle) (\bullet) (\blacksquare)	0,2	0,08	0,8	(*)
<i>L. costoris</i>	0,06	---	3,2 (\odot)	N
<i>P. macgheeii</i> (isolado 163 M, clone A)	0,1	---	0,4	N
<i>Phytomonas</i> sp. (E.p.) (isolado EM1) (\blacklozenge)	0,5	---	0,6	(*)
<i>Phytomonas</i> sp. (E.c.) (isolado EC2) (\triangle) (\blacklozenge) (\blacksquare)	0,7	---	3,4	N
<i>Phytomonas</i> sp. (J.m.)	0,04	---	---	N

Pares tipo 1: células apostas (freqüentemente promastigotas, mas outros estágios podiam ser encontrados) unidas pelas extremidades posteriores, estas sendo alargadas e/ou possuindo uma "linha" ou "anel" que cora pelo Giemsa.

Pares tipo 2: formados por uma célula alongada (geralmente promastigota) e uma célula semelhante a um sino, jarra ou chupeta.

Eventos sugestivos de transferência e fusão de núcleos: (*) encontrados durante as contagens para determinação dos percentuais aqui apresentados, (*) muito raros, (N) não encontrados.

(\triangle) presença de células semelhantes a um sino, jarra ou chupeta (% nas tabelas VI–IX).

(\diamond) ocorrência de diversos pares de células que podiam representar o final de uma divisão ou mesmo o contato inicial entre duas células; a região de contato era pequena e sem o "anel".

(\diamond) só estão computados os percentuais de células anucleadas livres. (\odot) alta freqüência de divisões anômalas.

(\blacklozenge) *Herpetomonas* spp. isoladas de *Euphorbia hyssopifolia* (E.h.) e *Solanum lycopersicum* (S.l.); *Phytomonas* spp. isoladas de *Euphorbia pinea* (E.p.), *E. characias* (E.c.) e *Jathropha macrantha* (J.m.). (\bullet) *Herpetomonas* sp. (L.s.) isolada de *Leptoglossus stigma* e *Leptomonas* sp. (O.v.) isolada de *Oncopeltus varicolor*. (\blacksquare) exigiram LIT 20% SFB.

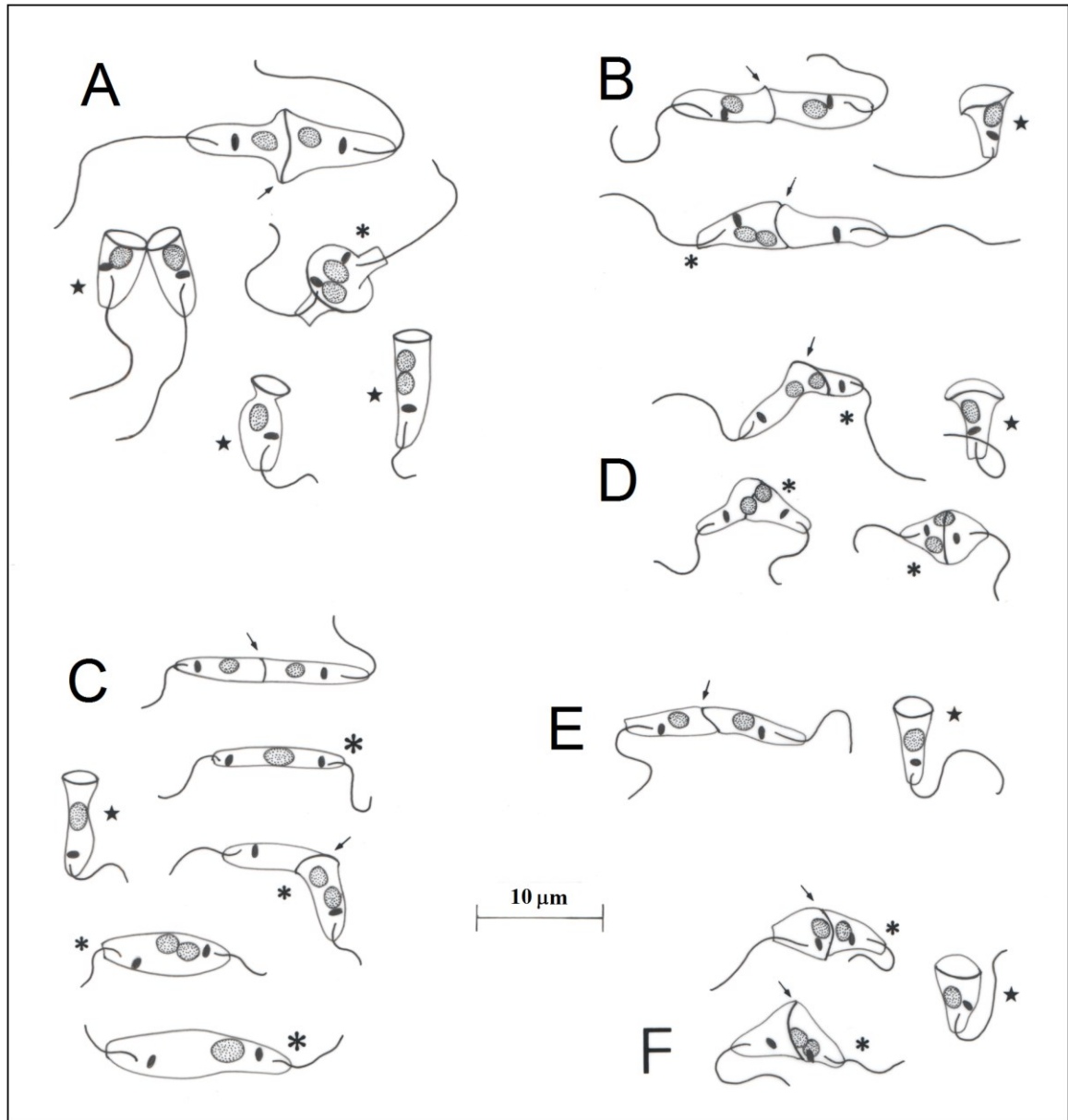


Figura 25. Pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em espécies de *Crithidia*: *C. fasciculata* (cepa *Culex*) (A), *C. guilhermei* (B), *C. flexonema* (clone 7E) (C), *C. hutneri* (D), *C. luciliae thermophila* (E) e *C. hamosa* (F). Note os pares de células apostas (com cinetoplasto ante- ou paranuclear) unidas pelas extremidades posteriores onde geralmente ocorre um alargamento, acompanhado ou não de uma "linha" que cora pelo Giemsa; pares tipo 1 (setas pequenas). Observe também as células semelhantes a "sinos" ou "jarras" com um ou dois núcleos (★). Em alguns pares, os dois núcleos estão numa das células ou parecem em migração, um em direção ao outro (*), ou estão aparentemente fundidos (*). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) entre 48–144 h. Todos os desenhos estão na mesma escala.

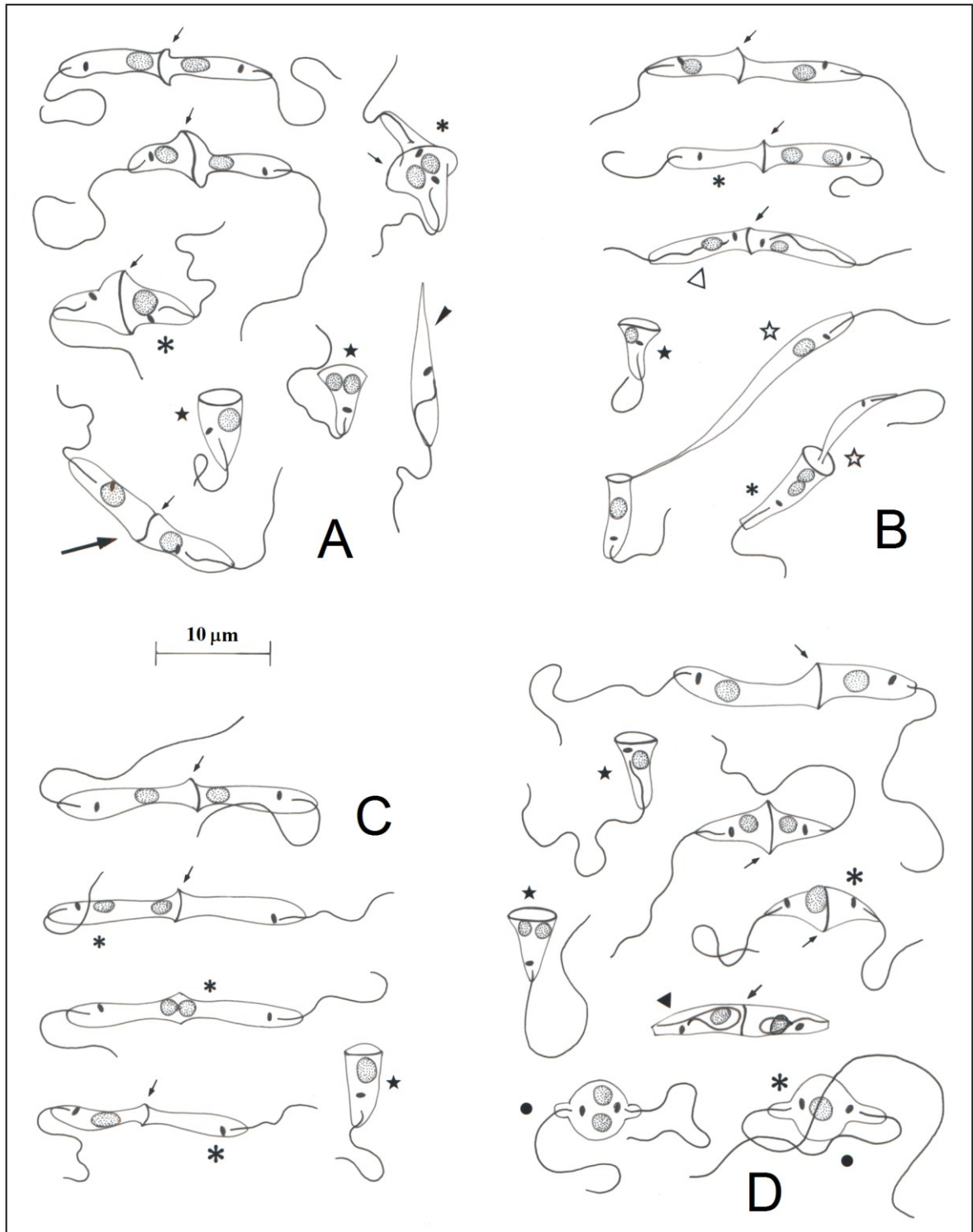


Figura 26. Pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em *Herpetomonas* isoladas de insetos: *Herpetomonas pessoai* (= *H. samuelpessoai*) (A), *H. megaseliae* (B), *H. muscarum muscarum* (C), *H. mariadeanei* (D). Note os pares de células apostas (na maioria dos casos promastigotas) unidas pelas extremidades posteriores, onde ocorre um alargamento geralmente acompanhado de uma "linha" que cora pelo Giemsa; pares tipo 1 (**setas menores**). Observe também os pares de paramastigotas (**seta maior**), opistomastigotas (▷) e endomastigotas (▶), além daqueles arredondados (●). Note as células "sino" com um ou dois núcleos (★), os pares formados por estas células e outra afilada; pares tipo 2 (☆), além da forma anucleada apresentada na Fig. A (**cabeça de seta**). Em alguns pares os dois núcleos estão numa das células ou parecem em migração, um em direção ao outro (*), ou estão aparentemente fundidos (*). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção do par de opistomastigotas (▷) (120 h). Todos os desenhos na mesma escala.

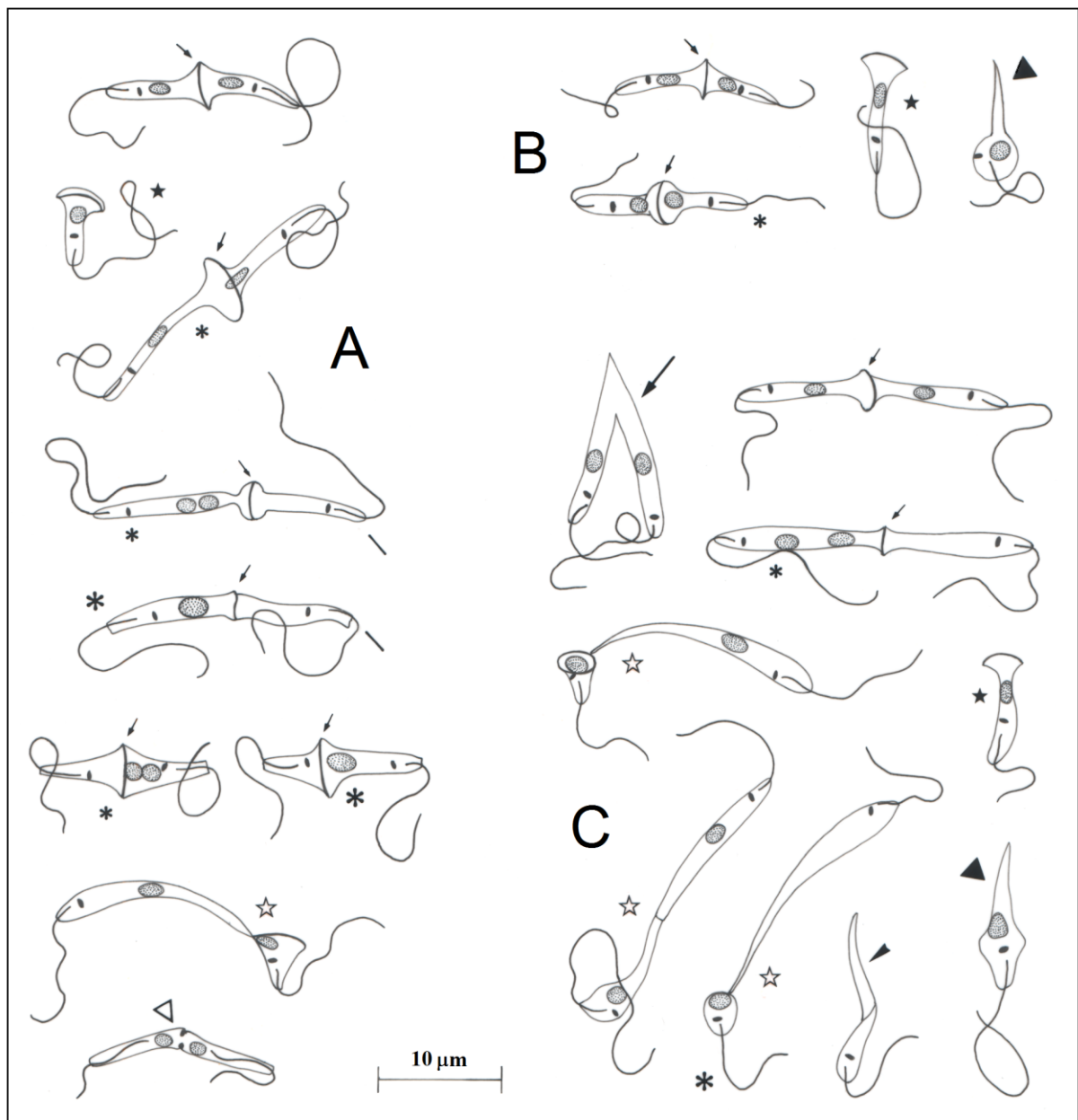


Figura 27. Pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em *Herpetomonas* isoladas de plantas: *Herpetomonas* sp. (E.h.) isolada de *Euphorbia hyssopifolia* (A), *Herpetomonas davidi* (isolado de McGhee & Postell, 1976) (B) e *Herpetomonas* sp. (S.l.) isolada de *Solanum lycopersicum* (C). Note os pares de células apostas (frequentemente promastigotas) unidas pelas extremidades posteriores onde ocorre um alargamento, em geral acompanhado de uma "linha" que cora pelo Giemsa; pares tipo 1 (setas menores). Observe também os pares de opistomastigotas (▷), as células "sino" com um ou dois núcleos (★), os pares formados por estas células (ou outro tipo, "chupeta" ou arredondada) e uma afilada; pares tipo 2 (☆), além da forma anucleada apresentada na Fig. C (cabeça de seta). Em alguns pares os dois núcleos estão numa das células ou parecem em migração, um em direção ao outro (*), ou estão aparentemente fundidos (✱). Note as células tipo "chupeta" que parecem uma fase de transição para a forma promastigota ou paramastigota (▶), além do estágio típico de divisão binária longitudinal na Fig. C (seta maior). Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas em LIT (~27,3°C) com 72 h, com exceção dos pares indicados na Fig. A por uma barra fina (48 h). Todos os desenhos estão na mesma escala.

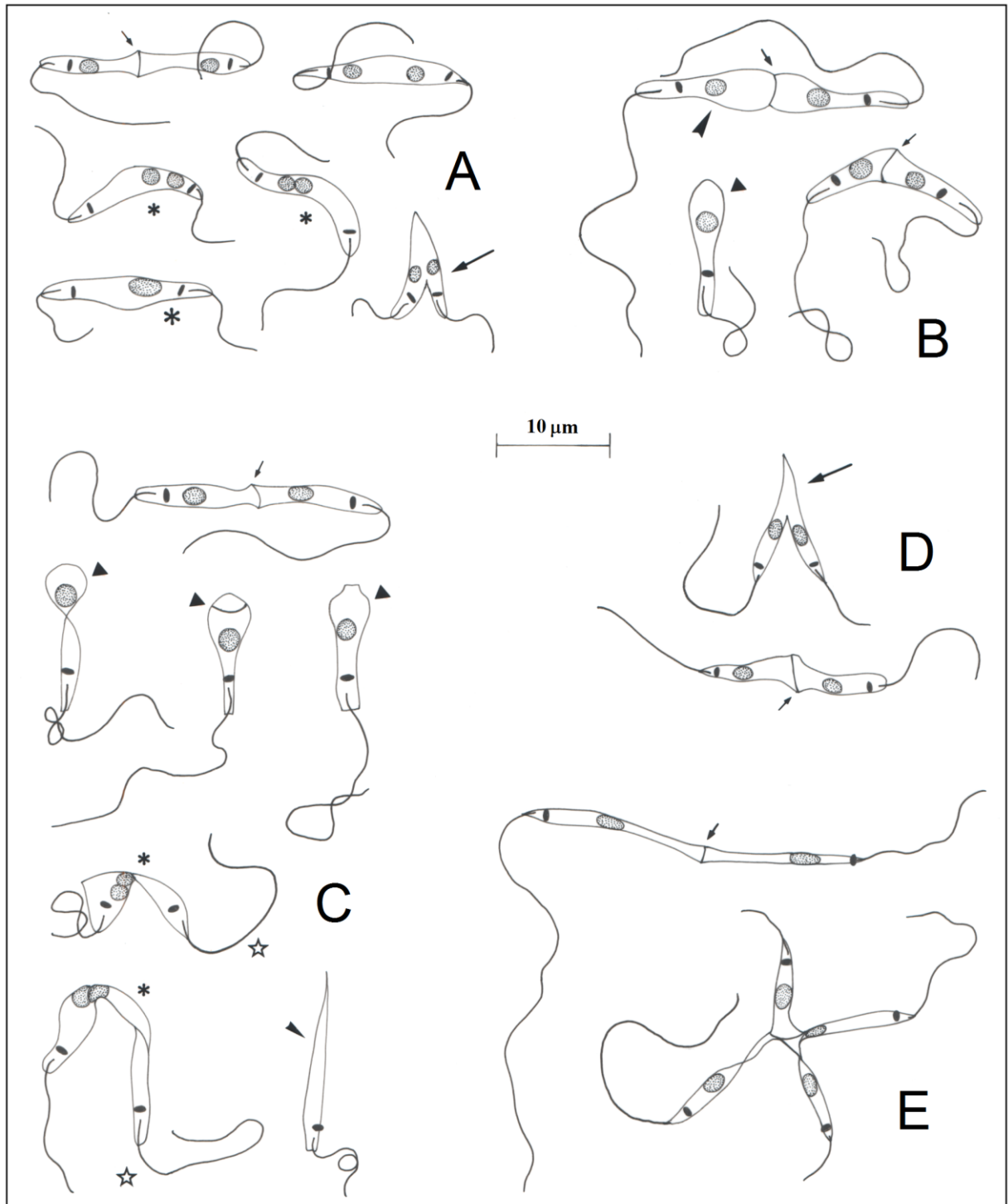


Figura 28. Pares de células e formas peculiares sugestivas de etapas de fenômenos de sexualidade encontradas em *Leptomonas pyrrocoris* (A), *L. wallacei* (clone B) (B), *Leptomonas* sp. (O.v.) isolada de *Oncopeltus varicolor* (C), *Phytomonas* sp. (E.p.) isolada de *Euphorbia pinea* (D) e *Phytomonas* sp. (E.c.) isolada de *E. characias* (E). Note os pares de promastigotas apostas unidas pelas extremidades posteriores onde ocorre um alargamento, acompanhado ou não de uma "linha" que cora pelo Giemsa; pares tipo 1 (**setas menores**). Nas Figs B e C, observe as células com a extremidade posterior alargada ou modificada (▲) e, na Fig. B, o par que parece composto por formas deste tipo (**cabeça de seta maior**). Na Fig. C, note também os pares peculiares, tipo 2 (☆) e a forma anucleada (**cabeça de seta menor**). Em alguns pares os dois núcleos estão numa das células ou parecem em migração, um em direção ao outro (*) ou aparentemente fundidos (*). Note os estágios típicos de divisão binária longitudinal (**setas maiores**) e as quatro células unidas pelas extremidades posteriores na Fig. E. Desenhos em câmara clara de células coradas pelo Giemsa (após tratamento com HCl) encontradas em esfregaços de culturas com 72 h em LIT (com 20% SFB no caso da *Leptomonas* sp. isolada de *O. varicolor* e *Phytomonas* sp. isolada de *E. characias*) (~27,3°C). Todos os desenhos estão na mesma escala.

4. DISCUSSÃO

4.1. Análise biológica, morfológica e biométrica de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas: importância para sua taxonomia

No presente trabalho, confirmamos a importância da análise biológica, morfológica e biométrica de tripanosomatídeos, desde que realizada sob condições experimentais padronizadas, como fonte de dados para a taxonomia destes organismos. Nossos resultados evidenciaram diferenças acentuadas ou semelhanças entre os organismos estudados, possibilitando o arranjo da maioria em **grupos**, diversos deles identificados com gêneros já propostos, além de **subgrupos**. Também revelaram diversos caracteres de valor diagnóstico (contestando outros) e questões taxonômicas, algumas das quais já evidenciadas por outras abordagens. Evidenciamos, com facilidade, a heterogeneidade de alguns gêneros classicamente aceitos, como *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Phytomonas*, confirmando-se resultados obtidos em diversas análises sorológicas, bioquímicas e moleculares (e.g. Camargo 1979, Gonçalves-de-Lima *et al.* 1979, 1982, Gueugnot *et al.* 1980, Camargo *et al.* 1982, 1992, Petry *et al.* 1987, 1989, Vainstein *et al.* 1987, Conchon *et al.* 1989, Ahomadegbe *et al.* 1990, Kolesnikov *et al.* 1990, Motta *et al.* 1991, Guerrini *et al.* 1992, Pacheco *et al.* 1994, Clark 1997, Fernandes *et al.* 1997, Muller *et al.* 1997, Teixeira *et al.* 1997, Bulat *et al.* 1999, Brandão *et al.* 2000). O presente estudo confirmou amplamente que os gêneros atualmente aceitos na família Trypanosomatidae são de fato insuficientes para representar sua real diversidade (Podlipaev *et al.* 1998, Sousa *et al.* 1998a, Bulat *et al.* 1999, Podlipaev & Rokitskaya 1999, Podlipaev 2000). Por outro lado, no caso de alguns organismos, verificamos que outras abordagens precisam ser utilizadas para confirmação das suas afinidades e posição taxonômica.

Classificações são tentativas de sintetizar o conhecimento sobre grupos de organismos de modo a facilitar o nosso entendimento de sua diversidade, mas a literatura está repleta de exemplos de que estas são sujeitas a modificações como consequência da ampliação do conhecimento sobre eles. Contudo, as posições de diferentes autores sobre algumas classificações podem ser discordantes por longos períodos de tempo. Na ausência de registros de fósseis de tripanosomatídeos, análises genômicas mais abrangentes, deste que associadas a informações básicas sobre estes parasitas, certamente trarão respostas sobre hipóteses de monofilia para diversos grupos, conforme sugeridas em diversos artigos, mas muitas vezes contraditórias (e.g. Rannala 1990, Faria-e-Silva *et al.* 1991, Du & Chang 1994, Muller *et al.* 1994, 1997, Pacheco *et al.* 1994, Marché *et al.* 1995, Maslov & Simpson 1995, Hollar & Maslov 1997,

Pires *et al.* 1997, Haag *et al.* 1998, Hollar *et al.* 1998, Maslov & Lukes 1998, Noyes 1998, Podlipaev & Bulat 1998, Podlipaev *et al.* 1998, Bulat *et al.* 1999, Slowinski & Page 1999, Podlipaev & Frolov 2000, Romeiro *et al.* 2000, Stevens 2000). Alguns dos **grupos** e **subgrupos** de espécies aqui propostos já foram confirmados por outras abordagens, mas outros devem ser oportunamente testados para verificação de sua monofilia. Entretanto, vale a pena assinalar que é comum que organismos semelhantes em diversos caracteres morfológicos também constituam grupos monofiléticos (Sneath & Sokal 1973).

Nos trabalhos sobre tripanosomatídeos de insetos ou plantas publicados até os meados dos anos 60, encontramos diversas informações valiosas, mas também muita divergência e/ou equívocos na diagnose dos gêneros da família Trypanosomatidae. Nas publicações posteriores, em especial nas revisões, estes gêneros continuaram sendo definidos, mas geralmente com base em poucos caracteres morfobiológicos e/ou morfométricos (*e.g.* Wallace 1966, 1979, Vickerman 1976, 1990, McGhee & Cosgrove 1980, Camargo & Wallace 1994). Com a ênfase dada nas últimas três décadas ao estudo dos microorganismos por técnicas bioquímicas e moleculares mais modernas, passou a vigorar a idéia, quase um consenso, de que era difícil, ou mesmo impossível e inapropriado, classificar ou identificar tripanosomatídeos de determinados gêneros por abordagens morfológicas ou biométricas (*e.g.* Camargo 1979, 1999, Molyneux *et al.* 1981, Gonçalves-de-Lima *et al.* 1982, Dollet 1984, 1994, Camargo *et al.* 1987, 1992, Petry *et al.* 1987, 1989, Conchon *et al.* 1989, Sbravate *et al.* 1989, Kolesnikov *et al.* 1990, Wallace *et al.* 1992, Camargo & Wallace 1994, Medina-Acosta *et al.* 1994, Marché *et al.* 1995, Sanchez-Moreno *et al.* 1995a, Dollet *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1996, 2000, Podlipaev & Bulat 1998, Bulat *et al.* 1999, Figueroa *et al.* 1999, Serrano *et al.* 1999a, b, c, Stevens *et al.* 1999, Podlipaev 2000).

No presente trabalho, caracterizamos diversas amostras disponíveis em cultura na "Coleção de Tripanosomatídeos" do Instituto Oswaldo Cruz (CT-IOC), fornecendo dados biológicos, morfológicos e biométricos para futuras comparações. Também organizamos estes organismos em **grupos** de acordo com suas características morfobiológicas, os quais podem ser considerados "**morfobiodemas**". Paralelamente, sugerimos uma revisão mais detalhada da diagnose de diversos gêneros, incluindo dois novos grupos com nomes genéricos já propostos, visando facilitar a identificação e a classificação dos tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas, com baixo custo. Através deste estudo, também resgatamos uma parte do conhecimento, quase esquecido, produzido por diversos pesquisadores nas primeiras décadas do século XX (*e.g.* Novy *et al.* 1907, Roubaud 1908, 1912, Lafont 1909, 1910, Wenyon 1913, 1926, França 1914, 1919, 1920, Woodcock 1914a, b, Becker 1923a, b, Aragão 1927, Stahel 1931) e

redescobrimos "com muita emoção" diversos de seus achados nas amostras que estudamos (ver Anexos 7.4).

No estado atual de nosso conhecimento, nove gêneros têm sido considerados para classificar tripanosomatídeos de insetos e/ou plantas: • *Crithidia* Léger, 1902 (c) (*sensu* Novy *et al.* 1907 e Wallace 1943), • *Wallaceina* (Podlipaev *et al.*, 1990) Podlipaev & Rokitskaya, 1999 (= *Proteomonas*), • *Angomonas* Sousa & Côrte-Real, 1991 (= *Angiomonas*), • *Herpetomonas* (Leidy, 1856) (*sensu* Prowazek 1904, *apud* Becker 1923a) (Flu 1911, Chatton & Alilaire 1908, Wenyon 1926, ver Anexo 7.4), • *Leptomonas* Kent, 1880, este último sendo seguramente uma mistura de táxons, sem definição de sua espécie-tipo (Camargo *et al.* 1992, Podlipaev *et al.* 1998, Sousa *et al.* 1998d, e, Podlipaev & Frolov 2000), • *Strigomonas* Lwoff & Lwoff, 1931 (Brandão *et al.*), • *Phytomonas* (Lafont, 1909) Donovan, 1909, • *Cercoplasma* (Roubaud, 1908) Roubaud, 1911, e • *Blastocrithidia* Laird, 1959. Entretanto, o gênero *Rhynchoidomonas* (Patton, 1910) Patton, 1910 precisa da confirmação de sua validade e diagnose. Como este último, também deveriam merecer maior atenção, com tentativas de isolamentos, aqueles tripanosomatídeos descritos em nematódeos, moluscos, rotíferos e protozoários ciliados, em especial para verificação de suas afinidades com as espécies isoladas de insetos.

Entre os parâmetros biométricos analisados no presente trabalho, destacamos como importantes para estudos taxonômicos com tripanosomatídeos: a determinação do comprimento do corpo (**C**) e do flagelo (**F**), mas sem somar estes valores, como havia sido sugerido por Wallace *et al.* (1983), além do cálculo da razão comprimento/largura (**C/L**) e do índice nuclear (**IN**), este último calculado de acordo com a proposta de Dias & Freitas (1943).

A razão **C/L** dá idéia das dimensões proporcionais do corpo do tripanosomatídeo, podendo ser útil para distinção entre os estágios de promastigotas e procoanomastigotas, como também entre paramastigotas e paracoanomastigotas (Figs 1, 2). Entretanto, a medição da largura (**L**) precisa ser feita somente em células que não tenham sofrido danos físicos, como ocorre, por exemplo, por excesso de homogeneização da cultura e inabilidade durante o preparo dos esfregaços, os quais também precisam ser corretamente fixados com Metanol anidro. O índice nuclear (**IN**) dá idéia da posição do núcleo no corpo celular e revelou-se de grande utilidade, tanto para distinguir espécies e subespécies de tripanosomatídeos, quanto para diferenciar estágios característicos de alguns grupos como, por exemplo, as formas aflageladas dos gêneros *Crithidia* e *Wallaceina* e aquelas encontradas em outros grupos.

Também enfatizamos a importância da tomada de medidas dos estágios evolutivos em separado, prática nem sempre utilizada ou citada em diversos trabalhos e revisões (*e.g.* Hanson & McGhee 1961, Wallace 1966, 1979, Dagget *et al.* 1972, Sá *et al.* 1980, Podlipaev *et al.*

1990, Sibajev *et al.* 1993), o que dificultou comparações com os nossos resultados. Outro problema que encontramos para fazer comparações decorreu tanto do fato de certos autores terem utilizado parâmetros que não selecionamos para a presente análise, quanto do fato de expressarem ou calcularem certas razões (índices) entre as medidas de maneira diferente da nossa (Becker 1923a, Wallace & Clark 1959, Wallace *et al.* 1960, 1965, Hanson & McGhee 1961, Wallace 1962, 1966, 1977 b, Hanson *et al.* 1966, Rogers & Wallace 1971, Bailey & Brooks 1972, McGhee & McGhee 1979, Beard *et al.* 1989, Podlipaev *et al.* 1991, Itow-Jankevicius *et al.* 1993, Podlipaev 1995, 1999, Podlipaev & Lobanov 1996). Por exemplo, o "índice nuclear" foi calculado por Podlipaev e seus colaboradores acima citados como uma razão inversa da que utilizamos. Estas colocações evidenciam a necessidade de uniformização dos critérios e parâmetros a serem utilizados em estudos morfométricos futuros.

Assinalamos que os resultados obtidos no presente trabalho sobre a intensidade de crescimento de tripanosomatídeos em culturas axênicas (Tabelas VI–IX, XXVII, XXVIII) revelaram-se de valor para o diagnóstico complementar de grupos, gêneros, espécies ou subespécies.

4.2. Questões de nomenclatura analisadas em algumas espécies e em um gênero

Com base no "Código Internacional de Nomenclatura Zoológica" (*apud* Papavero 1994, Ride *et al.* 1999), encontramos problemas com a nomenclatura de um gênero que propusemos anteriormente (*Angomonas* Sousa & Côrte-Real, 1991) e de algumas espécies.

Conforme já observado há muito tempo por Levine (1978) e mais recentemente por Bulat *et al.* (1999), o nome correto para *Herpetomonas samuelpeessoai* deveria ser *Herpetomonas pessoai* porque o nome da espécie proposto por Galvão *et al.* (1970) (*Leptomonas pessoai*) não poderia ter sido suprimido com a mudança do gênero. Assim, segundo estes autores, a espécie seria mais propriamente identificada como *H. pessoai* (Galvão *et al.*, 1970) Roitman *et al.*, 1976. Entretanto, a chamada *L. pessoai* havia sido clonada previamente, confirmando-se a presença de promastigotas e opistomastigotas em um dos seus clones, o qual foi classificado no gênero *Herpetomonas* (Carvalho 1973, Carvalho & Deane 1974). No entanto, Carvalho (1973) o identificou como *Herpetomonas muscarum*, entre outros motivos, porque o inseto do qual a amostra foi obtida (*Zelus leucogrammus*) é um predador, tendo moscas como uma de suas presas. Apesar deste equívoco, entendemos que cabe a Carvalho (1973) a prioridade da mudança de gênero da chamada "*Leptomonas*" *pessoai*. Assim, o nome desta espécie, em sua forma completa, ficaria *Herpetomonas pessoai* (Galvão, Oliveira, Carvalho & Veiga, 1970) Carvalho, 1973, embora este nome genérico seja assunto de discussão (ver item 4.4). No presente trabalho, utilizamos uma amostra desta espécie doada pelo Dr J. Angluster e verificamos que a mesma apresenta caracteres morfológicos e biométricos compatíveis com a

descrição feita por Carvalho (1973; compare prancha XIII do trabalho daquela autora com a nossa Fig. 14 A). Assinalamos que Ayroza-Galvão & Coutinho (1941) encontraram em fêmeas de um anofelino um tripanosomatídeo com estágios de epimastigotas e tripomastigotas, o qual identificaram como uma *Herpetomonas* (*H. pessoai* Ayroza-Galvão, 1941); por tratar-se de uma identificação equivocada, este nome genérico foi logo substituído (Wallace 1943, Wallace 1966), ou seja, antes da proposta de Carvalho (1973).

Outros problemas de nomenclatura que observamos foram os seguintes. As terminações dos nomes de duas espécies, *Crithidia deanei* (Carvalho, 1973) e *Herpetomonas mariadeanei* Yoshida *et al.*, 1978, que prestavam homenagem a uma mulher, Dra Maria Deane, deveriam ser "ae" e não "i" (*apud* Papavero 1994, p. 238). Assim, estas espécies deveriam ser chamadas, respectivamente, de *C. deanae* (= *A. deanae*) e *H. mariadeanae*. O nome *Phytomonas françai* Aragão, 1927 fica corretamente latinizado como *P. francai*, conforme diversos autores já têm utilizado (*e.g.* Wallace *et al.* 1992, Vickerman 1994, Camargo 1999). O nome proposto por Sousa & Côrte-Real (1991) para um novo gênero, *Angomonas*, deve ser latinizado corretamente como *Angiomonas*, a espécie-tipo passando a designar-se *A. deanae* (= "*C.* " *deanei*).

4.3. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e que apresentam a forma coanomastigota (resumida na Tabela XXVII)

A análise do conjunto de dados obtidos sobre diferentes amostras com a forma coanomastigota evidenciou que o grupo é consideravelmente heterogêneo, tanto em seu padrão de diferenciação e divisão celular, quanto em seus caracteres biométricos. É digno de nota, o número de formas evolutivas encontradas nas amostras deste grupo (confirmado em várias amostras após clonagem ou reclonagem), cujas taxas também variam consideravelmente e podem servir de base para sua classificação. De todas as amostras analisadas, a que apresentou menor número de estágios foi a *C. acanthocephali* (cinco), enquanto a *C. ricardoi* apresentou o maior número (onze), incluindo-se as formas em divisão, mas excluindo-se os estágios encontrados com taxas médias < 0,1%.

Os principais estágios encontrados neste grupo foram: procoanomastigotas, paracoanomastigotas, metacoanomastigotas e endocoanomastigotas (flageladas ou não), células modificadas na extremidade posterior, diversas delas com aspecto de "sino" ou "jarro", além das formas em divisão. Assinalamos que várias destas formas já haviam sido observadas por diversos pesquisadores, alguns no início deste século (Novy *et al.* 1907, Patton 1907, Strickland 1911, Woodcock 1914a, b, Wallace 1943, 1962, Hanson & McGhee 1963, Langridge & McGhee 1967, Carvalho 1973, Podlipaev *et al.* 1990, Sousa 1991, 1994a, Sousa & Côrte-Real 1991, Sousa *et al.* 1997a). Ressaltamos que a diversidade de estágios evolutivos que

observamos no gênero *Crithidia*, já havia sido vista e claramente ilustrada por Novy *et al.* (1907). Ver Anexo 7.4.1.

A maioria das amostras analisadas que apresentavam coanomastigotas pôde ser classificada em quatro **grupos (C 1–C 4)** (Tabela XXVII), estes aqui aceitos com *status* de gênero: **grupo C 1:** *Crithidia* Léger, 1902 (*sensu* Novy *et al.* 1907 e Wallace 1943) (espécie tipo: *C. fasciculata* Léger, 1902); **grupo C 2:** *Wallaceina* (Podlipaev *et al.*, 1990) {espécie-tipo: *W. inconstans* (Podlipaev, 1990) Podlipaev & Rokitskaya, 1999}; **grupo C 3:** *Angomonas* Sousa & Côrte-Real, 1991 {espécie tipo: *A. deanae* (Carvalho, 1973) Sousa & Côrte-Real, 1991}; **grupo C 4:** *Strigomonas* Lwoff & Lwoff, 1931 {espécie-tipo: *S. oncopelti* (Noguchi & Tilden, 1926) Thomson & Robertson, 1932}. Todos foram revistos no presente trabalho.

As amostras classificadas no gênero *Crithidia*, tanto quanto as espécies de *Wallaceina*, apresentam células aflageladas com cinetoplasto ante- ou paranuclear, as quais são muito peculiares por seus caracteres morfológicos e biométricos, ocorrendo livres ou aderidas entre si, que foram denominadas haptomonas por Woodcock (1914a). Tais formas foram observadas pela primeira vez por Legér (1903) em *C. campanulata* e, posteriormente, por Novy *et al.* (1907) em culturas de *C. fasciculata* (ver Anexo 7.4.1) e por Patton (1907), embora este último autor as tenha encontrado em uma mistura de espécies. Certamente tais formas correspondem àquelas que ocorrem agrupadas ou aderidas no intestino posterior do hospedeiro invertebrado, formando um "tapete", conforme descrito por diversos autores, às vezes em infecções mistas (*e.g.* Léger 1902c, Patton 1907, Woodcock 1914b, Langridge & McGhee 1967, Wallace 1943, 1966, 1979, Carvalho 1973).

No gênero *Crithidia* (**Grupo 1**), alguns **subgrupos (C 1a–C 1d)** puderam ser identificados com base em certas peculiaridades. No **subgrupo C 1a** incluímos a *C. fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei*, *C. luciliae*, *C. ricardo*i e *Crithidia* sp. (C.t.) (Figs 5 A–D, 6, 7 A), as quais apresentaram predomínio de promastigotas ou paracoanomastigotas, taxas elevadas de células em divisão em que os cinetoplastos ficam em diferentes posições em relação aos núcleos, um deles sendo antenuclear e o outro paranuclear (observaram-se taxas > 34,0% deste tipo), conforme ilustrado na Fig. 4g. As afinidades de diversas amostras deste **subgrupo** têm sido confirmadas também por estudos bioquímicos e moleculares (*e.g.* Newton 1976, Gueugnot *et al.* 1980, Faria-e-Silva *et al.* 1991, Camargo *et al.* 1992, Sibajev *et al.* 1993, Pacheco *et al.* 1994, Clark 1997, Fernandes *et al.* 1997, Pires *et al.* 1997, Brandão *et al.* 2000). No **subgrupo C 1b** incluímos apenas a *C. flexonema* (Fig. 7 B), na qual predominaram as procoanomastigotas, também como principal estágio de divisão. A análise desta amostra por "riboprinting" (Clark 1997) também revelou que a mesma tem padrão distinto das demais. No

subgrupo C 1c incluímos a *C. mellificae*, *C. hutneri* e *Crithidia* sp. (Z.1.) (Fig. 8), as quais apresentaram predominantemente paracoanomastigotas, também como principais formas de divisão (com os núcleos tanto no mesmo quanto em diferentes planos), além de células com a extremidade posterior de aspecto prismático (Fig. 8, cabeças de seta). No **subgrupo C 1d** incluímos apenas a *C. harmosa* (Fig. 9 B), a qual apresentou taxas médias semelhantes de procoanomastigotas e paracoanomastigotas, mas o processo de divisão ocorria predominantemente com os cinetoplastos em posição paranuclear.

As demais peculiaridades apresentadas pelas amostras do gênero *Crithidia* revelaram-se úteis para sua identificação como espécie e/ou subespécie. As duas variedades de *C. fasciculata* aqui estudadas (cepas *Anopheles* e *Culex*) são distintas por diversas características, inclusive pelo padrão de cariótipo molecular (Sousa *et al.* 1996; Anexo 7.3.5) e, assim sendo, ficariam melhor identificadas como espécies distintas, retendo-se o nome para a amostra em cultura mais antiga (*C. fasciculata*, cepa *Anopheles*; ATCC 11745) obtida por Noguchi & Tilden (1926). Por outro lado, uma *Crithidia* sp. (C.t.) obtida por Santos *et al.* (1994), isolada a partir de uma euforbiácea, apresentou grande similaridade com esta amostra, dela distinguindo-se principalmente por apresentar pequeninas endocoanomastigotas (Fig. 7 A, ☆). Acreditamos que este isolado seja uma subespécie de *C. fasciculata*. Já um novo isolado do *Zelus leucogrammus*, *Crithidia* sp. (Z.1.) (ver Anexo 7.3.7), compartilha diversas características biológicas, morfológicas e biométricas com *C. hutneri* como, por exemplo, células tipo "sino" relativamente grandes (Fig. 8 B, C, ★), embora apresente taxas mais elevadas de endocoanomastigotas e médias superiores de comprimento e largura em seus estágios aflagelados. Assim, identificamos esta amostra como uma subespécie de *C. hutneri*.

C. luciliae e *C. ricardoi* distinguem-se das demais espécies de *Crithidia* pelas taxas médias relativamente elevadas de metacoanomastigotas (0,5 e 0,7%) e de endocoanomastigotas (2,3 e 2,1%), respectivamente. Estas duas espécies distinguem-se uma da outra por certos caracteres, como a média do comprimento do flagelo superior à do corpo (diversos estágios) em *C. luciliae* (Fig. 5 D) e as dimensões menores das endocoanomastigotas encontradas em *C. ricardoi* (Fig. 6). Conforme já constatado por outros autores (Gonçalves-de-Lima *et al.* 1982, Camargo *et al.* 1982, 1992, Clark 1997, Fernandes *et al.* 1997, Brandão *et al.* 2000), nossos resultados também não confirmam que a chamada *C. luciliae thermophila* possa ser considerada subespécie de *C. luciliae* e, assim sendo, um novo nome deve ser proposto para a mesma. Alguns estudos bioquímicos e moleculares evidenciaram afinidades entre *C. luciliae thermophila* e *C. hutneri* (Gonçalves-de-Lima *et al.* 1982, Clark 1997), enquanto outros, como a análise do cariótipo molecular (Sousa *et al.* 1996) e do padrão eletroforético de histonas (Sá *et al.* 1980), além dos nossos atuais resultados, discriminaram estas espécies.

Entre as amostras aqui analisadas, *C. luciliae thermophila* e *C. acanthocephali* distinguiram-se das demais espécies de *Crithidia* (**grupo C 1**) por alguns caracteres, entre eles, crescimento mais intenso em meio LIT e presença de formas aflageladas sem tendência à agregação (Fig. 9 A, C; Tabela VI). Elas também diferem entre si por vários caracteres. *C. luciliae thermophila* apresenta maior número de estágios evolutivos, taxas mais elevadas de células aflageladas (estas freqüentemente com o flagelo parcialmente curvado) e de endocoanomastigotas, células tipo "sino", além de índice nuclear médio (IN= 1,4) no estágio de procoanomastigota muito superior ao de *C. acanthocephali* (IN= 0,7) (Fig. 9 A, C; Tabelas VI, XIV). Estas amostras também se revelaram distintas quando analisadas por técnicas bioquímicas e moleculares, como percentagens de ácidos graxos ciclopropano (Fish *et al.* 1981), perfis de "riboprinting" (Clark 1997), tamanho dos minicírculos (Brandão *et al.* 2000), ausência de hibridização cruzada com sondas de gene de mini-exon, entre si ou com outras espécies de *Crithidia* (Fernandes *et al.* 1997). No momento, sugerimos que outras análises sejam realizadas para melhor definir suas afinidades e posição taxonômica. Assim, ambas não estão incluídas entre aquelas do gênero *Crithidia* (item 4.7.1), nem no **grupo C 1** apresentado na Tabela XXVII.

Nossos estudos confirmaram que se justifica a manutenção do gênero *Wallaceina* (= *Proteomonas*) para tripanosomatídeos que apresentam, pelo menos em meio LIT, taxas médias elevadas (> 50%) de endocoanomastigotas, dividindo-se predominantemente neste estágio ou como paracoanomastigota, às vezes concomitantemente (Fig. 10 A, B; Tabelas VI, X). A conservação deste gênero também encontra suporte em estudos bioquímicos e moleculares (Pires *et al.* 1997, Bulat *et al.* 1999, Podlipaev & Rokitskaya 1999, Brandão *et al.* 2000, Podlipaev & Frolov 2000). Entretanto, assinalamos que as espécies deste **grupo (C 2)** compartilham caracteres com as do gênero *Crithidia* (Tabela XXVII), do qual parecem ter derivado.

O presente estudo confirmou que a chamada *Herpetomonas dedonderi* pode ter afinidades com o gênero *Crithidia*, mas apresenta peculiaridades que a distinguem das demais espécies deste grupo (Camargo *et al.* 1996; Anexo 7.3.4), como a acentuada modificação em suas medidas com o tempo de cultivo (Fig. 13; Tabela XXV). Estudos de hibridização molecular com sondas de kDNA de um clone desta espécie não revelaram homologias de seqüência com o kDNA de outros isolados de *Crithidia* e *Herpetomonas* (Pires *et al.* 1995). Assim, no momento, preferimos considerar esta espécie como *incertae sedis* e não a incluímos em qualquer dos grupos apresentados na Tabela XXVII.

Sousa & Côrte-Real (1991) propuseram a criação de um novo gênero *Angomonas* (= *Angiomonas*), palavra cuja raiz é derivada do grego (αγγος = vaso), para alocar a então chamada *Crithidia deanei* com base no achado de diversas formas tipicamente coanomastigota com cinetoplasto posnuclear (ver Anexo 7.2). Tais formas já haviam sido vistas pela

proponente da espécie (Carvalho 1973). Previamente, alguns autores (Figueredo *et al.* 1978, Yoshida & Camargo 1978, Camargo *et al.* 1982) já tinham observado as peculiaridades bioquímicas desta amostra. Subseqüentemente, Camargo *et al.* (1992) pesquisaram a presença de sítios de restrição para *Pvu* II numa seqüência de 360 pb da subunidade 18S do rDNA em diversas *Crithidia* spp., então verificando que somente *C. deanei* não apresentava sítio de clivagem para esta enzima. Neste trabalho (p. 46), esses autores declararam o seguinte: "*C. deanei* is a very atypical *Crithidia*, if a *Crithidia* at all". No presente estudo, confirmamos que esta espécie é muito peculiar pelo seu padrão de diferenciação celular, sendo predominantes os estágios de metacoanomastigota, inclusive nas formas de divisão (Fig. 11 A; Tabelas VI, X). Assinalamos que Faria-e-Silva *et al.* (1996) descreveram previamente este tipo de divisão na chamada "*H.* *roitmani*" e nossos resultados evidenciaram claramente que tanto esta última espécie quanto a chamada "*C.* *desouzai*" são muito semelhantes a "*C.* *deanei*" (*A. deanae*) em diversos caracteres (Fig. 11 A–C; Tabelas VI, X, XIV, XIX, XXIII, XXIV, XXVII). Assim, sugerimos a classificação de ambas também no gênero *Angomonas* (**grupo C 3**). Assinalamos que a diferenciação para metacoanomastigota observada nas amostras deste **grupo** não pode ser atribuída ao simbionte, uma vez que esta também ocorre nas cepas curadas, às vezes em taxas muito elevadas, conforme verificado por Faria-e-Silva *et al.* (1994) em "*H.* *roitmani*" e confirmado no presente trabalho em "*C.* *deanei*" (*A. deanae*). Acreditamos que outros isolados que apresentam endossimbionte e alta freqüência de metacoanomastigotas possam também pertencer ao gênero *Angomonas*, tal como aqueles descritos por Weinman & Cheong (1978) em culicídeos e por Fiorini *et al.* (1996) em frutos da amoreira. Como o meio LIT revelou-se muito favorável ao crescimento e diferenciação celular de todas as amostras deste **grupo**, o que não aconteceu com o meio FYTS (Sousa 1991), sugerimos que aquele seja escolhido para estudo e comparações de outras amostras que apresentem diferenciação para metacoanomastigota.

Assinalamos que diversos estudos têm confirmado não apenas a singularidade da espécie proposta como tipo do gênero *Angomonas* (*A. deanae*), como também evidenciaram afinidades entre as espécies reunidas aqui neste gênero {Faria-e-Silva *et al.* 1991, Motta *et al.* 1991, Previato *et al.* 1982, Camargo *et al.* 1992, Pacheco *et al.* 1994, Sousa *et al.* 1994 (ver Anexo 7.3.2), Clark 1997, Hollar *et al.* 1998, Brandão *et al.* 2000}. Entretanto, Malvezzi *et al.* (1996) consideraram que as espécies aqui reunidas no gênero *Angomonas* seriam distintas por diversos critérios, exceto pela presença de endossimbiontes e opistomorfas, estágios que denominamos metacoanomastigotas (Sousa *et al.* 1996; ver Anexo 7.3.5), e que este grupo certamente não seria monofilético. Fernandes *et al.* (1997) também não obtiveram sinais de hibridização com sondas de mini-exon entre as chamadas *C. deanei* e *C. desouzai*. Contudo, acreditamos que seja pouco provável que tantas semelhanças morfológicas, biológicas e

biométricas entre as espécies de *Angomonas* (Fig. 11; Tabelas VI, X, XIV) resultem de eventos de homoplasia. Por outro lado, um grupo é monofilético quando suas espécies compartilham um ancestral próximo comum, este fato não impedindo que elas possuam certos caracteres divergentes. Também enfatizamos que Hollar *et al.* (1998), com base em estudos de seqüências de genes rDNA (SSU), obtiveram evidências de que *A. roitmani* (codificada como TCC 080), o isolado TCC 263 (ambos estudados por Teixeira *et al.* 1997) e *A. deanae* são espécies filogeneticamente relacionadas, constituindo um **grupo** distinto daquele que inclui *C. oncopelti* e *Blastocrithidia culicis*.

Nossos resultados, como diversos outros estudos, têm confirmado que "*C.*" *oncopelti* (Fig. 12) é distinta por vários caracteres das espécies aqui classificadas nos gêneros *Crithidia*, *Wallaceina* ou *Angomonas* (Newton 1968, 1976, Gueugnot 1980, Camargo *et al.* 1982, 1992, Pestov *et al.* 1990, Pacheco *et al.* 1994, Marché *et al.* 1995, Clark 1997, Fernandes *et al.* 1997, Lukes *et al.* 1997, Pires *et al.* 1997, Teixeira *et al.* 1997, Haag *et al.* 1998, Hollar *et al.* 1998, Noyes 1998, Figueroa *et al.* 1999, Brandão *et al.* 2000) e, em função disso, aqui sugerimos sua classificação à parte, no **grupo C 4** (Tabela XXVII). Hollar *et al.* (1998) evidenciaram que "*C.*" *oncopelti* é filogeneticamente distante das amostras aqui classificadas no gênero *Angomonas*, mas levantaram uma dúvida sobre qual nome genérico seria mais indicado para as espécies com simbionte, *Angomonas* Sousa & Côte-Real (1991) ou o antigo *Strigomonas* Lwoff & Lwoff 1931. Diversos dos trabalhos acima citados, como também os nossos atuais resultados, não deixam dúvidas de que estas amostras devem ficar em grupos distintos. Assim sendo, entendemos que seja mais apropriado conservar o nome *Angomonas* para as espécies aqui reunidas no **grupo C 3** e resgatar o nome *Strigomonas*, com *status* de gênero, para "*C.*" *oncopelti*, conforme já utilizado por Thomson & Robertson (1932) e Grassé (1952). Entretanto, naquela ocasião este nome foi também empregado (como gênero ou subgênero) para *Crithidia fasciculata*, visando distinguir estas duas espécies das *Leptomonas* de pulga. Atualmente, não havendo dúvidas sobre a distinção entre *C. fasciculata* e "*C.*" *oncopelti*, o nome *Strigomonas*, mais recente que *Crithidia*, nos parece apropriado para a última, que deveria ser chamada *Strigomonas oncopelti* (Noguchi & Tilden, 1926) Thomson & Robertson, 1932 (espécie-tipo, ATCC 12982).

Nosso trabalho evidenciou que também pode ocorrer diferenciação para metacoanomastigota na cepa curada de *S. oncopelti* (ATCC 30264). Tal padrão de diferenciação, igualmente observado nas cepas curadas do gênero *Angomonas*, sugere que nestas amostras a capacidade de migração do cinetoplasto para a posição posnuclear possa ter surgido em um organismo ancestral, antes da aquisição do simbionte.

Temos observado em diversas análises filogenéticas (*e.g.* Maslov *et al.* 1996, Lukes *et al.* 1997, Haag *et al.* 1998, Hollar *et al.* 1998) a inclusão da *S. oncopelti* e da chamada *Blastocrithidia*

culicis (amostra que também apresenta endossimbionte) em um mesmo clade. Como estas amostras são muito distintas morfologicamente, temos estranhado para tais resultados. Nossa experiência com diferenciação de tripanosomatídeos nos leva a admitir, como possível, uma hipótese proposta por Baker (1963) e Wallace (1966) sobre a existência de duas linhagens básicas de tripanosomatídeos, as quais diferem quanto ao local de abertura da bolsa flagelar, em uma delas sendo lateral e, na outra, terminal. Sendo esta a principal diferença morfológica entre estas espécies, acreditamos que as hipóteses de monofilia para as mesmas necessitam de uma reavaliação. Por outro lado, Sousa (1994a) descreveu em *B. culicis* (amostra isolada de *Aedes vexans*, fêmea), além de típicos epimastigotas, também tripomastigotas, discutindo a possibilidade deste isolado ser um representante do gênero *Trypanosoma* (ver Anexo 7.1.2).

4.4. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas e previamente identificados como *Herpetomonas* (resumida na Tabela XXVII)

Reverendo a literatura, constatamos que foram identificados, ou aceitos, como *H. muscarum* (ou com o nome antigo *H. muscae domesticae*) parasitas encontrados no intestino de *Musca domestica* ou outros muscóides, os quais eram diferentes entre si, ou mesmo representavam uma mistura de espécies (Alexeieff 1911, Wenyon 1913, 1926, França 1920, Becker 1923a, b, Drbohlav 1926, Bellosillo 1937, Wallace & Clark 1959, Wallace 1966, 1979, Rogers & Wallace 1971, Bailey & Brooks 1972, Brun 1974, Vickerman 1976, 1990). Possivelmente, Flu (1911) e Becker (1923a, b) foram os primeiros a admitir a existência de organismos diferentes no intestino de moscas, estes sendo de pelo menos dois tipos (ver Anexos 7.4.2–7.4.4). Um deles usualmente maior, freqüentemente biflagelado e tendo o cinetoplasto volumoso, corresponderia à verdadeira *H. muscae domesticae* de Prowazek (1904). Assinalamos que organismos semelhantes foram encontrados pela maioria dos autores acima citados. O segundo tipo, segundo Becker (1923a, b) teria o corpo e o cinetoplasto menores, além de raras formas biflageladas, assemelhando-se à então chamada *Crithidia calliphorae* descrita por Swellengrebel (1911) (ver Anexo 7.4.3). Wenyon (1913, 1926) também reconheceu a existência destes dois tipos, além de um terceiro, este apresentando tripomastigotas semelhantes às encontradas no gênero *Rhynchoidomonas*, mas considerou todos como estágios de *H. muscarum*. Wenyon (1926) também incluiu organismos do tipo *L. mirabilis* no gênero *Herpetomonas*, identificando-os como *H. muscarum*, em virtude da presença de opistomastigotas, que considerava um caráter distintivo do gênero, um equívoco que foi adotado por diversos autores durante décadas, nos incluindo (ver Anexos 7.1 e 7.3).

Wallace (1966) forneceu uma longa lista de sinônimos para *H. muscarum*, descrevendo esta espécie como tendo formas alongadas, flagelo duplo e estágios com cinetoplasto

posnuclear, mas incluiu organismos distintos nesta mesma, entre eles a *H. muscarum* original (*sensu* Prowazek, 1904) (ver Anexos 7.4.2 e 7.4.3). Posteriormente, Rogers & Wallace (1971) propuseram duas subespécies para *H. muscarum*: *H. m. muscarum* e *H. m. ingenoplastis*, esta última sendo maior, tendo o cinetoplasto volumoso e muitas formas biflageladas.

No presente trabalho, estudamos estas "subespécies" e confirmamos que as diferenças entre elas são realmente muito acentuadas (Fig. 15 A, B; Tabelas VII XI, XV, XXVII), parecendo injustificável classificá-las na mesma espécie, como também no mesmo gênero. Tais diferenças já tinham sido verificadas por análises bioquímicas e moleculares {Yoshida *et al.* 1978, McGhee & Cosgrove 1980, Fish *et al.* 1981, Camargo *et al.* 1982, Coombs 1988 *apud* Vickerman 1994, Sousa *et al.* 1996 (ver Anexo 7.3.5), Redman & Coombs 1997}, como também pelas características ultraestruturais do cinetoplasto (Wallace *et al.* 1973), o qual, no caso da *H. m. ingenoplastis*, apresenta um arranjo especial e não contém minicírculos (*apud* Englund *et al.* 1982). Assim, o *status* de subespécies para estas amostras já foi questionado (Redman & Coombs 1997).

Diante do exposto, uma questão que se apresentou no presente trabalho, foi identificar entre as chamadas *Herpetomonas* que analisamos, qual poderia corresponder à *H. muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880, espécie-tipo do gênero *Herpetomonas* Kent, 1880, encontrada em *Musca domestica* e identificadas como *Bodo*, *Bodo muscarum*, *Bodo muscae domesticae* (Burnett 1851-1852, Leidy 1856 e Stein 1878; *apud* Hoare 1924, Wenyon 1926), provavelmente por conta de suas formas biflageladas. Assim, logo concluímos que o organismo que se assemelhava à espécie-tipo do gênero *Herpetomonas* (ver Anexo 7.4.2) era a chamada *H. muscarum ingenoplastis* (ATCC 30259) (Fig. 15 B), pelas suas dimensões avantajadas, cinetoplasto volumoso com formato peculiar e muitas formas biflageladas, mas não *H. m. muscarum* (ATCC 30260) (Fig. 15 A). Conforme reconhecido por diversos autores (*e.g.* Becker 1923a, b, Wenyon 1913, 1926), também acreditamos que as formas biflageladas de *H. m. ingenoplastis* derivam de um processo de divisão estagnado (lento, demorado), sem a imediata divisão do cinetoplasto e do núcleo. Confirmamos que o crescimento desta espécie é extremamente difícil em cultura axênica (Tabela VII), o que propiciaria o acúmulo destas formas, facilitando sua visualização. A presença de formas biflageladas é tão marcante em *H. m. ingenoplastis*, que seu valor diagnóstico é inegável para identificação de um típico representante do gênero *Herpetomonas*, conforme proposto por Prowazek (1904, *apud* Becker 1923a, b). Também concluímos que as demais espécies identificadas como *Herpetomonas* (Figs 14, 16) eram de fato muito distintas de *H. m. ingenoplastis*, sendo necessário um novo nome genérico para elas, com outra diagnose.

Nossos estudos também revelaram que as chamadas *Herpetomonas* têm em comum o fato de apresentarem quase que exclusivamente formas flageladas nos estágios de promastigota e paramastigota (Figs 14–16; Tabelas VII, XXVII). Esta característica pode estar

relacionada com uma tendência destes organismos, como também de outros que a apresentam, ocorrerem livres no intestino ou em outras regiões do inseto hospedeiro, conforme já mencionado por diversos autores (Wallace 1943, 1966, 1979, Wallace & Clark 1959, Langridge & McGhee 1967, Bailey & Brooks 1972, Moraes *et al.* 1994).

No presente trabalho, também confirmamos que estágios com cinetoplasto posnuclear (opistomastigotas, metacoanomastigotas/opistomorfias) podem ocorrer em tripanosomatídeos de outros gêneros ou grupos, além de *Herpetomonas* (Figs 5 D, 6, 7 B, 8 A, 9 C, 10–12, 13 B, C, 19, 20; Tabelas VI, VIII, XXIII, XXVII, XXVIII). Assim sendo, não podem ser de valor diagnóstico para este gênero, como foi considerado durante quase um século (*e.g.* Wenyon 1926, Wallace 1966, 1979, Vickerman 1976). Curiosamente, é possível que formas com cinetoplasto posnuclear possam ter sido vistas pela primeira vez em *C. fasciculata* (Novy *et al.* 1907) (Anexo 7.4.1) e na chamada *L. mirabilis* Roubaud (1908), mas só posteriormente nas *Herpetomonas* (Swellengrebel 1911, Chatton & Léger 1911 *apud* Roubaud 1912) (Anexos 7.4.3 e 7.4.4).

Com base em nossos resultados, as amostras identificadas como *Herpetomonas* foram classificadas em 2 **grupos** (**H 1** e **H 2**). No **grupo H 1** incluímos apenas a chamada *H. muscarum ingenoplastis* (Fig. 15 B), a qual é consideravelmente distinta das demais (Figs 14, 15 A, 16; Tabelas XV, XXVII). Estas últimas foram então reunidas no **grupo H 2**, este com três **subgrupos** (**H 2a–H 2c**), cujo *status* de gênero ou subgênero ainda não pôde ser definido. A Tabela XXVII resume esta classificação, com as características de cada grupo.

Os **subgrupos H 2a–H 2c** foram identificados com base em certas peculiaridades das amostras estudadas. No **subgrupo H 2a** incluímos *H. muscarum muscarum* (Fig. 15 A), *H. megaseliae* (Fig. 14 D), *H. davidi*, além das *Herpetomonas* spp. (E.h.), (S.l.) e (L.s.) (Fig. 16). No **subgrupo H 2b** incluímos apenas a chamada *H. mariadeanei* (Fig. 14 C), a qual distingue-se das demais tanto pela presença de formas biflageladas, embora em taxas médias baixas (0,4%), quanto porque não apresenta estágios de transição entre para- e opistomastigota, o que nos leva a supor que este último derive das endomastigotas. No **subgrupo H 2c** incluímos *H. pessoai* e *H. anglusteri* (Fig. 14 A, B), as quais distinguem-se daquelas dos **subgrupos H 2a** e **H 2b**, principalmente por serem, em geral, menores e mais alargadas (Tabela XV). Resultados de diversos autores também confirmam que as chamadas *H. muscarum*, *H. pessoai* e *H. mariadeanei* podem pertencer a diferentes grupos (Yoshida *et al.* 1978a, b, Fish *et al.* 1981, Wallace *et al.* 1983, Muller *et al.* 1994, Teixeira *et al.* 1997, Bulat *et al.* 1999). Por outro lado, nossos resultados não confirmam que a chamada *H. anglusteri* tem afinidades com o gênero *Crithidia*, conforme sugerido por alguns autores (Teixeira *et al.* 1997). Todas as amostras aqui classificadas no **subgrupo H 2a** apresentaram padrão de bandeamento cromossômico muito

semelhante (sem a banda cromossômica de ~2.200 kb) e distinto dos padrões das amostras dos **subgrupos H 2b e H 2c** (Sousa *et al.* 1996, 1997d), tendo também sido confirmadas como organismos afins por diferentes abordagens (*e.g.* Yoshida *et al.* 1978b, Camargo *et al.* 1982, Faria-e-Silva 1991, Muller *et al.* 1994, Nunes *et al.* 1994, Hollar & Maslov 1997, Teixeira *et al.* 1997, Hollar *et al.* 1998, Figueroa *et al.* 1999, Romeiro *et al.* 2000).

4.5. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de insetos e identificados previamente como *Leptomonas* (resumida na Tabela XXVIII)

No presente trabalho, confirmamos amplamente a heterogeneidade das amostras previamente identificadas como *Leptomonas* com base em caracteres morfológicos (Wallace 1977b, Sousa *et al.* 1998d, e), tal como constatada por técnicas bioquímicas e moleculares (Camargo *et al.* 1992, Muller *et al.* 1994, Teixeira *et al.* 1997, Podlipaev *et al.* 1998, Podlipaev & Rokitskaya 1999, Podlipaev & Frolov 2000). Os nossos resultados estão apresentados nas Figs 17–21 e nas Tabelas VIII, XII, XVI, XVII, XX, XXII, XXIII, XXV e XXVIII. Este gênero tem sido utilizado há muito tempo (*e.g.* Wallace 1966, 1979, Vickerman 1976, 1990), inclusive por nós (Sousa *et al.* 1998a; Anexo 7.3.10), para classificar tripanosomatídeos monoxênicos que apresentam promastigotas, acompanhadas ou não de "cistos" flagelares, e cujos caracteres não se encaixavam nos demais gêneros conhecidos. Como nas amostras que estudamos também encontramos paramastigotas (taxas médias: 0,6–38,2%) e, em algumas delas, também opistomastigotas, chegamos a sugerir que o estágio de paramastigota fosse incluído na diagnose do gênero *Leptomonas* (Sousa *et al.* 1998e). Entretanto, após a revisão da literatura, conforme exposto a seguir, concluímos que, no presente momento, o gênero *Leptomonas* ainda é um enigma, como também é inteiramente equivocada a classificação de parasitas distintos e mal conhecidos no mesmo.

O gênero *Leptomonas* foi proposto por Kent (1880) para um parasita encontrado por Bütschli (1878) no intestino de um nematódeo (*Trilobus gracilis*), tendo como espécie-tipo a chamada *L. bütschlii* (*apud* Grassé 1952, Wallace 1966, 1979, Vickerman 1976). Contudo, não há certeza de que este organismo fosse de fato um tripanosomatídeo (Nicoli *et al.* 1971a, b, Podlipaev 2000). O primeiro parasita de inseto incluído neste gênero foi *L. jaculum* Léger, 1902 (Léger 1902a, b), espécie provavelmente cistogênica, com base na descrição de seus estágios pós-flagelados (Porter 1909). Chatton (1924) e Goodey & Triffit (1927) (*apud* Wenyon 1926, Grassé 1952) também encontraram tripanosomatídeos no tubo digestivo de nematódeos, mas Nicoli *et al.* (1971a, b), admitindo que *L. bütschlii* seria um euglenóide, entenderam que o gênero *Leptomonas* deveria ser rejeitado. Na ocasião, estes autores propuseram dois novos gêneros: *Nematodomonas* {espécie-tipo: *N. goodeyi* (Nicoli, 1965)}, para tripanosomatídeos

encontrados em nematódeos e *Malacoozomonas* {espécie-tipo: *M. patellae* (Porter, 1914)} para aqueles encontrados em moluscos (Fantham 1925, *apud* Wenyon 1926).

Entretanto, apesar da imprecisão da descrição do gênero *Leptomonas* proposto por Kent (1880) (*apud* França 1920, Vickerman 1976) e da falta de maiores estudos para confirmação da natureza da *L. bütschlii*, o nome deste gênero continuou a ser utilizado para classificar os mais diversos tripanosomatídeos, incluindo espécies que seriam posteriormente identificadas como *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, além de isolados de moluscos, rotíferos e protozoários ciliados {e.g. Wenyon 1926, Chatton 1938 (*apud* Grassé 1952), Gilles & Hanson 1963, Wallace 1966, 1977b, 1979, Freedman & Hanson 1970, Vickerman 1976, Görtz 1986, Görtz & Dieckmann, 1987)}. Freedman & Hanson (1970), inclusive admitiram a possibilidade, de que ciliados infectados pudessem atuar como vetores ou reservatórios para infecções de metazoários. A seguir, transcrevemos a posição de Wallace (1966, p. 157) sobre este assunto: "If a restudy of protozoa from the type host of *L. bütschlii* should show them to be different from the insect *Leptomonas*, it will be true that there is a group of insect parasites fitting the above synopsis which would require a new generic name and type species". Por fim, entendemos que, no momento, ainda é difícil confirmar a existência do gênero *Leptomonas*, definir sua diagnose, além de decidir, entre organismos tão distintos incluídos neste grupo, qual, se algum, poderia representá-lo. Um problema adicional decorre do fato de que os tripanosomatídeos de nematódeos, moluscos, rotíferos e protozoários ciliados ainda não foram comparados entre si ou com *L. jaculum*, o que possibilitaria o reconhecimento de existência ou não de afinidades entre eles.

Contudo, de acordo com as comparações que fizemos entre os nossos resultados e aqueles da literatura, se alguma similaridade morfológica existe entre a primeira espécie encontrada em inseto e identificada como *Leptomonas*, *L. jaculum* (Legér 1902a, b, Porter 1909), e as que estudamos, esta seria com as amostras cistogênicas isoladas de insetos fitófagos (*L. wallacei* e *Leptomonas* sp. O.v.) (Fig. 21). Entretanto, estudos complementares são necessários para verificar esta possibilidade, incluindo o isolamento de tripanosomatídeos dos hospedeiros originais deste gênero.

No presente trabalho, por conta sua grande diversidade das amostras que foram identificadas como *Leptomonas*, estas foram classificadas em sete **grupos (L 1–L 7)** (Figs 17–21; Tabelas VIII, XII, XVI, XVII, XX, XXII, XXIII, XXV, XXVIII). Um destes grupos inclui um isolado que se distingue muito dos demais, a chamada *L. mirabilis* (Fig. 19 C; Tabela VIII), conforme constatado também por outros estudos (Fish *et al.* 1981, Muller *et al.* 1997), e aqui propomos sua classificação em um gênero à parte (Tabela XXVIII; **grupo L 5**). Nenhuma das amostras destes sete grupos apresentou endomastigotas e quatro espécies apresentaram opistomastigotas (Figs 19, 20; Tabela VIII). Algumas amostras não apresentaram células

promastigotas ou paramastigotas aflageladas ou estas foram muito raras, enquanto outras possuíam este estágio (Tabela VIII). Neste último caso, tais formas pareciam relacionadas com processos de adesão (haptomonas) (e.g. Figs 18 D, 19 C, 20) ou com "cistos" flagelares (Figs 20, 21), mas todas eram claramente distintas das formas aflageladas encontradas nos gêneros *Crithidia*, *Wallaceina* e *Phytomonas*. Na maioria das amostras previamente identificadas como *Leptomonas*, as promastigotas ocorreram em taxas médias superiores a 70%, com exceção de *L. mirabilis* (Tabela VIII). Nossos dados possibilitaram uma clara distinção entre um isolado de pulga semelhante a *L. ctenocephali* (*L. pulexsimulantis*) e as espécies de *Crithidia*, uma dificuldade que havia sido apontada por Molyneux *et al.* (1981) em estudos ao M.E.

No **grupo L 1** incluímos as amostras que não apresentaram células aflageladas, ou estas eram muito raras, nem opistomastigotas ou "cistos" flagelares. Conforme assinalamos em relação às amostras previamente identificadas como *Herpetomonas*, que também só raramente apresentam pro- ou paramastigotas aflageladas, é possível que os organismos deste grupo não sejam adaptados à adesão em seus hospedeiros (Wallace 1977b, Moraes *et al.* 1994). Neste grupo distinguimos três **subgrupos**. As amostras do **subgrupo L 1a**, no qual incluímos dois isolados de *Lutzomyia ayrozai* (Fig. 17), distinguem-se daquelas do **subgrupo L 1b** (*L. pyrrocoris* e *L. seymouri*; Fig. 18 A, B) porque apresentam crescimento muito menos acentuado, além de promastigotas biflageladas, embora em taxas inferiores a 1% (Tabela VIII). No **subgrupo L 1c** incluímos apenas *L. collosoma* (Fig. 18 C), única entre as chamadas *Leptomonas* que apresentou células tipo "sino"/"jarro", formas que podiam ser encontradas em *Herpetomonas* (**subgrupo H 2a**) e *Crithidia* (Tabelas VI–VIII, XXVI). Entre as amostras do **grupo L 1**, *L. collosoma* foi também a única que apresentou promastigotas e paramastigotas aflageladas, embora em percentuais médios < 0,1. Esta amostra também não possui bandas cromossômicas de ~2,2 kb (Béjà *et al.* 1994), tal como todas as amostras analisadas do **grupo H 2a** (Sousa *et al.* 1996).

Embora tenhamos verificado a presença de raras opistomastigotas em *L. samueli* (Fig. 19 A; Tabela VIII), nossos resultados não evidenciaram claramente as afinidades desta espécie, aqui classificada no **grupo L 2**, tanto com aquelas incluídas no **grupo L 1**, quanto com aquelas identificadas como *Herpetomonas* (**grupo H 2**). Assinalamos que a identificação desta espécie como *Herpetomonas* já foi sugerida por alguns autores (Camargo *et al.* 1992, Teixeira *et al.* 1997). Por suas peculiaridades, *L. lactosovorans* (Fig. 19 B) também foi classificada em um grupo à parte (**grupo L 3**). Esta espécie, além de apresentar opistomastigotas, possui promastigotas e paramastigotas aflageladas, estas usualmente livres. No **grupo L 4** incluímos apenas a chamada *L. costoris* (Fig. 18 D), espécie considerada pelos seus proponentes como semelhante a *L. jaculum* (Wallace *et al.* 1965). Contudo, nossos resultados revelaram que *L. costoris* assemelha-se a *L. mirabilis* pelo formato do corpo celular (Figs 18 D e 19 C), o qual

corresponde a um dos tipos encontrados nesta última (ver abaixo), e pelas suas formas aflageladas com tendência à agregação. Como difere em outros caracteres, suas afinidades precisam ser avaliadas por outras abordagens.

A singular *L. mirabilis* foi classificada no **grupo L 5**, sugerindo-se para a mesma o resgate do nome genérico *Cercoplasma* proposto por Roubaud (1911a), no qual já havia sido identificada, juntamente com *L. mesnili*. Estas duas espécies apresentam formas "gigantes" e opistomastigotas e foram consideradas típicas do gênero *Cercoplasma*, sendo então chamadas de *C. mirabilis* e *C. mesnili*. Enfatizamos que Roubaud (1908, 1911a) fez uma descrição confusa, tanto para *L. mirabilis*, quanto para o gênero *Cercoplasma*, provavelmente porque lidava com mistura de espécies. Posteriormente, por conta das opistomastigotas, Wenyon (1926) transferiu estas duas espécies para o gênero *Herpetomonas*, juntamente com outras vistas por Patton (1921) e Swingle (1921), as quais também apresentavam formas "gigantes", interpretadas como um crescimento anormal do parasita na ausência de divisão do corpo. Examinando o conjunto de nossos resultados sobre as chamadas *Herpetomonas* e *L. mirabilis*, parece-nos um equívoco reunir espécies tão distintas no mesmo gênero, como outros também observaram (Wallace & Todd 1964).

Wallace & Todd (1964) conseguiram isolar uma amostra que identificaram como *L. mirabilis* (ATCC 30263), a qual apresentava concomitantemente formas "gigantes" e opistomastigotas. Contudo, acreditando que estas últimas seriam estágios de uma *Herpetomonas* contaminante (*H. muscarum*), as retiraram da diagnose da espécie, idéia mantida em outros trabalhos (Wallace 1966, Brun 1974). Foi precisamente este isolado de *L. mirabilis* que estudamos (CT-IOC 024) e o incluímos como referência para o gênero *Cercoplasma* Roubaud 1911, com uma proposta de revisão de sua diagnose. Verificamos que esta espécie apresenta uma complexa e única combinação de formas (Fig. 19), entre elas, as opistomastigotas e dois tipos celulares distintos, um deles com a porção anterior do corpo arredondada, que se afina gradualmente, podendo apresentar uma ou mais torções (Fig. 19 C), enquanto o outro tipo inclui promastigotas finas, espiraladas, longas e também, embora raramente, "gigantes" (~70–200µm), estas de grande valor diagnóstico (Fig. 19 C; Tabela VIII). Curiosamente, o primeiro tipo foi ilustrado por Roubaud (1908) e o outro por Wallace & Todd (1964). Outras características apresentadas por *C. mirabilis* foram: crescimento extremamente difícil em cultura axênica, altas taxas de formas espiraladas, promastigotas e paramastigotas em percentuais próximos, células aflageladas alongadas e com a extremidade anterior truncada.

As amostras cistogênicas foram aqui classificadas em dois **grupos** separados por apresentarem caracteres muito distintos. Num deles (**grupo L 6**) incluímos apenas a chamada *L. pulexsimulantis* (Fig. 20; Tabela VIII), a qual apresenta crescimento muito difícil em LIT, sendo

extremamente polimórfica, possuindo promastigotas, paramastigotas e opistomastigotas, além de formas aflageladas adaptadas à adesão, mas distintas daquelas apresentadas pelas espécies de *Crithidia* e *Wallaceina* e *Phytomonas*. *L. pulexsimulantis* assemelha-se muito a diversos outros isolados de pulga (e.g. Wenyon 1926, Gibbs 1947, Wallace 1966, 1979), sendo aqui confirmada como cistogênica. Ela possui dois tipos de promastigotas (Tabela XVII), aqui referidos como tipo 1 (espiralado, Fig. 20, indicado por ▷) e tipo 2 (alargado, Fig. 20, indicado por ►), os quais se parecem com as formas encontradas em *L. ctenocephali*, respectivamente, nas larvas e no inseto adulto parasitado (Gibbs 1947).

As demais espécies cistogênicas isoladas de insetos fitófagos diferem marcadamente das amostras cistogênicas de pulgas. Assim, foram classificadas no **grupo L 7**: *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.) obtida de *Oncopeltus varicolor* (Fig. 21 A, B; Tabela XXVIII). Estas amostras podem apresentar paramastigotas, às vezes em taxas muito baixas, mas nelas não ocorrem opistomastigotas (Tabela VIII). Nestas espécies, também ocorre dimorfismo de promastigotas (Tabela XVII), mas este não corresponde àquele de *L. pulexsimulantis*. Um dos tipos (aqui referido como tipo 3) tem a extremidade posterior afilada, em geral apenas uma torção no corpo e o núcleo em posição central ou anterior, enquanto o outro (referido como tipo 4) apresenta a extremidade posterior arredondada (aspecto de "raquete"; Fig. 21, ►), na qual freqüentemente fica o núcleo. Este dimorfismo já havia sido observado por Tieszen *et al.* (1989) em uma amostra cistogênica isolada de inseto fitófago, a chamada *L. lygaei*. Assinalamos que *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.) foram classificadas separadamente (Tabela XXVIII) nos **subgrupos L 7a** e **L 7b**, respectivamente, que se distinguem, entre outros caracteres, pela maior intensidade de crescimento da primeira, a qual também apresentou modificação em seus caracteres biométricos a partir de 96 h de cultivo (Tabelas VIII, XXV). Entretanto, os "cistos" flagelares (escleromastigotas) com cinetoplasto antenuclear ou paranuclear encontrados nestas duas amostras apresentaram dimensões muito semelhantes, apesar de terem procedido de culturas em diferentes meios (Fig. 21, Tabela XXII). As amostras do **grupo L 7** assemelham-se à chamada *L. oncopelti* (Noguchi & Tilden 1926, McGhee & Hanson 1964) e, embora, sem certeza absoluta, uma delas, *Leptomonas* sp. (O.v.), foi identificada com esta espécie (Romeiro *et al.* 2000). A análise do cariótipo molecular destas amostras, também confirmou que elas são de fato espécies distintas (Romeiro *et al.* 2000).

4.6. A heterogeneidade de tripanosomatídeos isolados de plantas e identificados previamente como *Phytomonas* (resumida na Tabela XXVII)

As amostras de *Phytomonas* aqui estudadas já haviam sido confirmadas como representantes do gênero por diversos estudos sorológicos, bioquímicos e moleculares (e.g.

Camargo *et al.* 1987, 1992, Petry *et al.* 1989, Teixeira & Camargo 1989, Nunes *et al.* 1994, 1995, Teixeira *et al.* 1994, 1996, 1997). Por seus caracteres morfológicos (Sousa *et al.* 1997c, 1998c; ver Anexo 7.3.3), estas amostras distinguem-se claramente de outras não afins com o gênero *Phytomonas*, embora tenham sido isoladas a partir de vegetais (McGhee & Postell 1976, Attias & De Souza 1986, Fiorini *et al.* 1986). Na literatura existem diversas descrições morfológicas que apontam as características típicas do gênero *Phytomonas*, as quais confirmamos no presente trabalho (*e.g.* Lafont 1910, Noc & Stevenel 1911, França 1914, 1919, 1920, Aragão 1927, Stahel 1931, Harvey & Lee 1943, Gibbs 1957, Vermeulen 1963, McGhee & Hanson 1964, Paulin & McGhee 1971, Dollet 1984, Kastelein *et al.* 1984, Podlipaev 1986, Jankevicius *et al.* 1989, Wallace *et al.* 1992, Itow-Jankevicius *et al.* 1993, Sanchez-Moreno *et al.* 1995a; ver Anexos 7.4.5– 7.4.7). Contudo, em diversos trabalhos temos encontrado menções a dificuldades para distinguir espécies de *Phytomonas* de outros tripanosomatídeos que apresentam promastigotas, sem que técnicas sorológicas, bioquímicas ou moleculares sejam empregadas (*e.g.* Dollet 1984, 1994, Camargo *et al.* 1987, 1992, Petry *et al.* 1987, 1989, Conchon *et al.* 1989, Sbravate *et al.* 1989, Camargo & Wallace 1994, Marché *et al.* 1995, Sanchez-Moreno *et al.* 1995a, Dollet *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1996, 2000, Camargo 1999, Serrano *et al.* 1999a, b, c).

Nossos resultados confirmaram que os representantes do gênero *Phytomonas* distinguem-se facilmente dos demais tripanosomatídeos por um conjunto de caracteres (Figs 22–24; Tabelas IX, XIII, XVIII, XXI) e, assim sendo, foram aqui classificadas no **grupo P 1** (Tabela XXVII). Neste gênero, as promastigotas são absolutamente predominantes, podendo ser espiraladas. Estas apresentam acentuada variação no tamanho do flagelo, além de um processo de divisão muito peculiar, que origina células com flagelos de tamanhos muito diferentes, ou uma forma flagelada e a outra não (caráter de grande valor diagnóstico). Suas formas sem flagelo livre são alongadas, sem tendência à agregação e podem se dividir (Fig. 22 C, D). As espécies de *Phytomonas* que foram analisadas têm características em comum com a espécie-tipo, *P. davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909 (ver Anexos 7.4.5 e 7.4.6). Entretanto, o isolado de McGhee & Postell (1976) foi erroneamente identificado como sendo esta espécie (*e.g.* Dollet *et al.* 1984, Dollet & Wallace 1987, Camargo *et al.* 1987, 1992, Sousa *et al.* 1997c, 1998c), mas depois reclassificado como *H. davidi* (Camargo *et al.* 1992, 1999, Teixeira *et al.* 1997). Assim sendo, enfatizamos que *H. davidi* não corresponde a *P. davidi*.

Nossos estudos também evidenciaram a heterogeneidade do gênero *Phytomonas*, conforme constatada por diversas técnicas bioquímicas e moleculares (*e.g.* Ahomadegbe *et al.* 1990, 1992, Guerrini *et al.* 1992, Muller *et al.* 1994, 1995, 1997, Marché *et al.* 1995, Serrano *et al.* 1999a). Com base em certos caracteres morfológicos e biométricos, as amostras aqui

estudadas foram classificadas em cinco **subgrupos (P 1a–P 1e)** (Tabela XXVII). No **subgrupo P 1a** incluímos dois isolados, *P. serpens* e *Phytomonas* sp. (C.b.) (Fig. 22 A, B), os quais, entre as amostras estudadas, apresentaram melhor crescimento em meio LIT (Tabela IX). No **subgrupo P 1b** reunimos três espécies, *P. macgheeii*, *P. francaii* e *Phytomonas* sp. (J.m.) (Figs 22 A, 24 A, B), as quais apresentaram gradual alargamento do corpo com o tempo de cultivo, acompanhado do surgimento de formas elípticas ou arredondadas, cujo flagelo (todo ou em parte) era aparentemente aderido, originando tipos semelhante a esferomastigotas (Fig. 24 A, B, barras finas; Tabela XXV). Formas semelhantes a estas já haviam sido encontradas por alguns dos autores acima citados, entre eles, Aragão (1927; figuras 5 e 6), Stahel (1931; figura 8; ver Anexo 7.4.7) e Itow-Jankevicius *et al.* (1993). Neste último artigo, veja a forma 25 da figura 1, a qual pode ser confundida com uma opistomastigota, mas que possivelmente corresponde a uma célula com flagelo aderido ao corpo. No **subgrupo P 1c** incluímos apenas *Phytomonas* sp. (A.c.) (Fig. 22 D), espécie que apresentou crescimento muito difícil e taxas muito elevadas de formas aflageladas (> 50%) (Tabela IX). No **subgrupo P 1d** só incluímos *Phytomonas* sp. (E.p.), cujo comprimento do corpo e do flagelo, além do número de torções, aumentou com o tempo de cultivo, mas sem alterações na largura (Fig. 23 A; Tabela XXV). No **subgrupo P 1e** incluímos apenas *Phytomonas* sp. (E.c.), a qual apresentou crescimento difícil mesmo em LIT 20% SFB, divisão predominantemente com os núcleos em diferentes planos, sendo a amostra de maiores dimensões (corpo e flagelo) entre as espécies de *Phytomonas* aqui analisadas (Fig. 23 B; Tabelas IX, XIII, XVIII, XXI).

No presente trabalho, confirmamos que tripanosomatídeos com caracteres de gêneros considerados monoxênicos podem ser isolados de vegetais (Conchon *et al.* 1989, Almeida 1993, Dollet 1984, Santos *et al.* 1994, Fiorini *et al.* 1986, 1996, Sousa *et al.* 1997d), pois uma das amostras que estudamos, esta obtida a partir de *Chamaesyce thymifolia* (Santos *et al.* 1994), pôde ser facilmente identificada como *Crithidia* sp. (Fig. 7 A), enquanto outras, como *H. davidi*, *Herpetomonas* sp. (E.h.) e *Herpetomonas* sp. (S.l.) (Fig. 16 A–C), apresentavam caracteres morfológicos e biométricos típicos das amostras do **subgrupo H 2a**. Entretanto, ainda não temos certeza se todos estes isolados são efetivamente parasitas de vegetais, neles cumprindo uma etapa de seu ciclo de vida (mesmo que opcional), ou se foram obtidos apenas por serem contaminantes fortuitos procedentes de fezes de insetos infectados (Dollet 1984, Conchon *et al.* 1989, Nunes *et al.* 1994). Em trabalho anterior, identificamos três amostras muito semelhantes entre si como *Herpetomonas* spp. (Sousa *et al.* 1997d; Anexo 7.3.6), uma delas tendo sido isolada de tomate e as outras duas de insetos fitófagos capturados em tomateiros. Na ocasião, mencionamos a possibilidade de que algumas amostras identificadas como *Herpetomonas* e isoladas de plantas pudessem ser heteroxênicas. Conchon *et al.* (1989) também verificaram que

algumas espécies identificadas como *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* podiam multiplicar-se experimentalmente em tomates. Também assinalamos que Cavazzana *et al.* (1998) infectaram espécimes de *Leptoglossus zonatus* com tripanosomatídeos de diversos gêneros, além de *Phytomonas*, após transmitindo-os através destes insetos a vegetais (tomate ou milho).

4.7. Propostas de revisão da diagnose de alguns gêneros da família Trypanosomatidae

O presente trabalho forneceu muitos dados que possibilitaram a classificação de diversos tripanosomatídeos de insetos e plantas em **grupos** distintos, os quais também podem ser chamados de "**morfobiodemas**" (Tabelas XXVII, XXVIII), sendo que alguns deles têm o *status* de gênero. Assinalamos que todas as amostras analisadas foram cultivadas e analisadas em condições padronizadas em todos os aspectos possíveis. Assim, propusemos uma revisão da diagnose de sete gêneros da família Trypanosomatidae com base em seus caracteres morfológicos, visando simplificar, com baixo custo, a sua identificação e classificação.

Quatro das espécies que foram aqui estudadas (*C. luciliae thermophila*, *C. acantocephali* e "*H. dedonderi*") não puderam ser classificadas nos **grupos** que definimos (Tabelas XXVII, XXVIII), nem em qualquer dos gêneros cuja diagnose foi revista. Por outro lado, apesar de várias amostras terem sido classificadas nos grupos que propusemos, elas não puderam ser alocadas nos gêneros revistos. Este foi o caso de diversos isolados identificados como *Herpetomonas* (**grupo H 2**) e *Leptomonas* (**grupos L 1–L 4, L 6, L 7**), pois a validade destes gêneros é questionável e o assunto precisa de uma cuidadosa revisão.

4.7.1. Gênero *Crithidia* Léger, 1902 (*sensu* Novy *et al.* 1907 e Wallace 1943)

- ◆ **Características gerais:**
 - ◆ crescimento bom ou muito bom em meio LIT (~30.000–70.000 células/ μ l; médias entre 48–144 h).
 - ◆ procoanomastigotas e/ou paracoanomastigotas predominantes.
 - ◆ médias máximas de comprimento do corpo em pro- e paracoanomastigotas ~10,0 e 9,0 μ m, respectivamente.
 - ◆ metacoanomastigotas (opistomorfias) ausentes ou muito raras (< 1,0%).
 - ◆ endocoanomastigotas presentes na maioria das espécies, mas em percentuais baixos (\leq 2,3).
 - ◆ presença de formas aflageladas peculiares, com cinetoplasto principalmente paranuclear, com médias máximas do comprimento ~7,0 μ m; núcleo próximo à extremidade posterior, geralmente arredondada; livres ou aderidas (haptomonas), aos pares ou em grupos maiores, em taxas médias variáveis < 10,0%.
 - ◆ presença de células semelhantes a um "sino" ou "jarro" em médias variáveis (< 9,0%).
 - ◆ em algumas espécies, acentuada variação na forma da extremidade posterior do corpo.
 - ◆ divisão, principalmente, com cinetoplastos paranucleares ou em diferentes posições (ante- e paranuclear) e núcleos em diferentes planos.
- ◆ **Dimensões médias em meio LIT (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflagelados (72 h); meta- e endocoanomastigotas (72–144 h).

Estágios	C (μ m)	L (μ m)	C/L	F (μ m)	IN
procoanomastigotas	7,2–10,6	2,4–2,9	2,9–4,3	5,4–10,7	0,7–1,4
paracoanomastigotas	7,1–9,4	2,3–3,2	2,4–3,5	3,2–11,6	0,9–1,6
endocoanomastigotas (tipo 1)	5,4–9,3	2,2–3,0	1,9–4,1	1,1–7,5	0,4–0,9
endocoanomastigotas (tipo 2)	5,0–7,4	2,3–2,7	2,0–3,2	0,3–2,1	0,6–0,8
metacoanomastigotas (*)	5,2–6,9	2,0–2,5	2,3–3,6	1,4–8,4	0,8–1,0
aflageladas (ante)	5,6–7,2	2,4–3,1	2,0–2,5	-----	0,3–0,7
aflageladas (para)	5,2–7,3	2,4–2,9	1,9–2,8	-----	0,4–0,8

Algumas formas com cinetoplasto antenuclear podem ser relativamente alongadas e confundir o diagnóstico. Nas demais, a forma coanomastigota apresenta-se característica. Endocoanomastigotas: (**tipo 1**) o flagelo não contorna o núcleo, (**tipo 2**) o flagelo contorna o núcleo. (*) também chamadas de opistomorfias. (**ante**) com cinetoplasto antenuclear, (**para**) com cinetoplasto paranuclear.

- ◆ **Hospedeiros:** Principalmente insetos; isolamento raro a partir de vegetais.
- ◆ **Espécie-tipo:** *Crithidia fasciculata* Léger, 1902
- ◆ **Espécies analisadas e incluídas no gênero:** *Crithidia fasciculata* (cepas *Anopheles* e *Culex*), *C. guilhermei*, *C. luciliae*, *C. ricadoi*, *C. flexonema*, *C. mellificae*, *C. hutneri*, *C. hamosa*, *Crithidia* sp. (C.t.) e *Crithidia* sp. (Z.l.).
- ◆ **Notas:** Sugerimos que a amostra mantida há mais tempo em cultura (*C. fasciculata*, cepa *Anopheles*; ATCC 11745, CT-IOC 048) seja utilizada como referência. Ressaltamos a importância do trabalho de Novy *et al.* (1907), no qual a diversidade de estágios encontrados em *Crithidia* está claramente ilustrada (ver Anexo 7.4.1). Todas as amostras aqui citadas estão depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, elas foram classificadas no **grupo C 1** (com 3 subgrupos).

4.7.2. Gênero *Wallaceina* (Podlipaev *et al.*, 1990) (= *Proteomonas*)

- ◆ **Características gerais:** ◆ bom crescimento em LIT (~25.000–38.000 células/μl; médias entre 48–144 h). ◆ endocoanomastigotas predominantes (> 55,0%), com médias máximas do comprimento do corpo ~6,0–7,0μm. ◆ procoanomastigota e paracoanomastigotas em taxas médias < 13,0% e ~30,0%, respectivamente. ◆ comprimento do corpo de pro- e paracoanomastigotas com médias máximas de ~9,0 e 8,0μm, respectivamente. ◆ metacoanomastigotas (opistomorfos) presentes em percentuais médios < 1,0 ◆ presença de formas aflageladas peculiares, com cinetoplasto ante- ou paranuclear, médias máximas do comprimento do corpo ~6,0μm, núcleo próximo à extremidade posterior do corpo, geralmente arredondada; formas livres ou aderidas (haptomonas), aos pares ou em grupos maiores, em taxas médias variáveis variáveis < 4,0%; estágios iguais àqueles encontrados no gênero *Crithidia*. ◆ células "sino" ou "jarro" ausentes ou raras. ◆ divisão, principalmente, como paracoanomastigota e endocoanomastigota, com núcleos em diferentes planos.
- ◆ **Dimensões médias em meio LIT (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflagelados (72 h); metacoanomastigotas (72–144 h).

Estágios	C (μm)	L (μm)	C/L	F (μm)	IN
procoanomastigotas	9,2–9,6	2,5–2,6	3,8	7,2–8,1	0,9–1,4
paracoanomastigotas	7,5–8,1	2,6	3,0–3,1	5,9–6,3	1,0–1,2
endocoanomastigotas (tipo 1)	7,2	2,6–2,7	2,7–2,8	1,3–3,5	0,7–0,8
endocoanomastigotas (tipo 2)	6,0–7,0	2,6–2,8	2,4–2,5	0,2	0,8–0,9
metacoanomastigotas (*)	5,5–5,8	2,4	2,4	2,9–3,3	0,7–0,9
aflageladas (ante)	6,1–6,2	2,5	2,6	-----	0,4
aflageladas (para)	5,5–6,0	2,4–2,7	2,3–2,4	-----	0,4

Algumas formas com cinetoplasto antenuclear podem ser relativamente alongadas e confundir o diagnóstico. Nas demais, a forma coanomastigota apresenta-se característica. Endocoanomastigotas: (**tipo 1**) o flagelo não contorna o núcleo, (**tipo 2**) o flagelo contorna o núcleo. (*) também chamadas de opistomorfos. (**ante**) com cinetoplasto antenuclear, (**para**) com cinetoplasto paranuclear.

- ◆ **Hospedeiros:** insetos.
- ◆ **Espécie-tipo:** *Wallaceina inconstans* (Podlipaev *et al.*, 1990) Podlipaev & Rokitskaya, 1999.
- ◆ **Espécies analisadas e incluídas no gênero:** *Wallaceina inconstans* e *W. brevicula*.
- ◆ **Notas:** Este gênero foi inicialmente denominado *Proteomonas* Podlipaev *et al.*, 1990. Amostra sugerida como referência: *W. inconstans* (CT-IOC 192), procedente de S. A. Podlipaev. As amostras aqui citadas estão depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, elas foram classificadas no **grupo C 2**.

4.7.3. Gênero *Angomonas* Sousa & Côrte-Real, 1991 (= *Angiomonas*)

- ◆ **Características gerais:** ◆ crescimento excelente em meio LIT (>70.000–100.000 células/ μ l; médias entre 48–144 h). ◆ metacoanomastigotas (opistomorfas) predominantes (médias > 55,0%), comprimento do corpo com médias máximas < 5,0 μ m ◆ taxas médias de procoanomastigotas < 4,0%; comprimento do corpo com médias máximas ~7,0 μ m. ◆ taxas médias de paracoanomastigotas < 25,0%; comprimento do corpo com médias máximas ~5,0 μ m. ◆ taxas médias de endocoanomastigotas < 0,5%. ◆ ausência de células aflageladas com cinetoplasto antenuclear. ◆ células aflageladas com cinetoplasto paranuclear em percentuais médios < 1,6, em geral livres e com núcleo na porção posterior do corpo; médias do comprimento do corpo ~5,0 μ m. ◆ ausência de células semelhantes a um "sino" ou "jarro". ◆ divisão, predominantemente, no estágio de metacoanomastigota. ◆ todas as espécies conhecidas possuem simbionte bacteriano no citoplasma.

- ◆ **Dimensões médias em meio LIT (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflageladas (72 h); metacoanomastigotas (72–120 h); endocoanomastigotas (72–144 h).

Estágios	C (μ m)	L (μ m)	C/L	F (μ m)	IN
procoanomastigotas	5,4–7,2	1,8–2,2	2,6–3,5	4,8–6,9	0,5–0,9
paracoanomastigotas	5,1–5,5	1,9–2,3	2,3–2,8	4,5–5,1	0,5–0,9
endocoanomastigotas (tipo 1)	5,0–5,9	2,3–2,6	2,0–2,5	0,4–3,4	0,5–0,7
metacoanomastigotas (*)	4,5–4,7	1,9–2,1	2,3–2,5	1,1–1,3	0,9–1,0
aflageladas (para)	4,7–5,1	2,2–2,6	1,8–2,3	----	0,5–0,7

Algumas formas com cinetoplasto antenuclear podem ser relativamente alongadas e confundir o diagnóstico. Nas demais, a forma coanomastigota apresenta-se característica. Endocoanomastigotas: (**tipo 1**) o flagelo não contorna o núcleo. (*) também chamadas de opistomorfas. (**para**) com cinetoplasto paranuclear.

- ◆ **Hospedeiros:** insetos, mas já há registro do isolamento também a partir de frutos.
- ◆ **Espécie-tipo:** *Angomonas deanae* (Carvalho, 1973) Sousa & Côrte-Real, 1991.
- ◆ **Espécies analisadas e incluídas no gênero:** *Angomonas deanae*, *A. desouzai* e *A. roitmani*.
- ◆ **Notas:** A espécie escolhida como tipo do gênero *Angomonas* foi inicialmente denominada *Crithidia deanei* Carvalho, 1973. Amostra sugerida como referência: *A. deanae* (ATCC 30255, CT-IOC 044). As espécies deste gênero são as de menores dimensões entre as estudadas no presente trabalho. As amostras aqui citadas estão depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, elas foram classificadas no **grupo C 3**.

4.7.4. Gênero *Strigomonas* Lwoff & Lwoff, 1931 (revisto)

- ◆ **Características gerais:** ◆ crescimento bom em meio LIT (~25.000 células/ μ l; média entre 48–144 h). ◆ paracoanomastigotas predominantes (média ~80,0%), com média do comprimento do corpo ~8,0 μ m ◆ metacoanomastigotas (opistomorfas) presentes (média: ~5,0%), com comprimento médio do corpo ~6,0 μ m. ◆ procoanomastigotas com taxa média de 1,7%; média do comprimento do corpo ~8,5 μ m. ◆ forma do corpo peculiar, sendo usualmente alargado na porção anterior e afilado na posterior. ◆ endocoanomastigotas ausentes. ◆ ausência de células aflageladas com cinetoplasto antenuclear. ◆ células aflageladas com cinetoplasto paranuclear em taxas médias < 1,0% e usualmente livres. ◆ células semelhantes a um "sino" ou "jarro" ausentes. ◆ divisão, predominantemente, como paracoanomastigota e com os núcleos no mesmo plano. ◆ a única espécie conhecida apresenta simbionte bacteriano no citoplasma.

- ◆ **Dimensões médias em meio LIT (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflagelados (72 h); metacoanomastigotas (72–120 h). Única espécie disponível em cultura.

Estágios	C (μ m)	L (μ m)	C/L	F (μ m)	IN
procoanomastigotas	8,5	3,0	2,9	8,9	1,0
paracoanomastigotas	7,9	2,9	2,7	7,7	1,4
metacoanomastigotas (*)	5,8	2,8	2,1	4,6	1,4
aflageladas (para)	8,7	3,0	3,0	-----	1,3

(*) também chamadas de opistomorfas. (**para**) cinetoplasto paranuclear.

- ◆ **Hospedeiros:** insetos ou vegetais (?).
- ◆ **Espécie-tipo:** *Strigomonas oncopelti* (Noguchi & Tilden, 1926) Thomson & Robertson, 1932.
- ◆ **Espécie analisada:** *Strigomonas oncopelti* (ATCC 12982, CT-IOC 055), amostra sugerida como referência (= *Crithidia oncopelti*)
- ◆ **Notas:** O nome *Strigomonas* foi proposto por Lwoff & Lwoff (1931) como subgênero, tanto para esta espécie, quanto para *C. fasciculata*, na ocasião ambas identificadas como *Leptomonas*. Alguns autores (e.g. Wallace 1943, Hoare 1967, Vickerman 1976) consideraram os nomes genéricos *Crithidia* e *Strigomonas* como sinônimos. Como sabemos que o gênero *Crithidia* é válido e que *C. fasciculata* é muito distinta da chamada *C. oncopelti*, propusemos o resgate do nome *Strigomonas* como gênero para esta espécie (Brandão *et al.* 2000). A amostra aqui citada está depositada na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, ela foi classificada no **grupo C 4**.

4.7.5. Gênero *Herpetomonas* Kent, 1880 (*sensu* Prowazek 1904) (revisto)

- ◆ **Características gerais:** ◆ crescimento extremamente difícil, exigindo LIT 20% SFB (~10.000 células/ μ l; média entre 48–144 h). ◆ predominância absoluta de promastigotas (média > 90,0%), com dimensões avantajadas e núcleo geralmente central. ◆ médias do comprimento do corpo e do flagelo de ~25,0 μ m e ~29,0 μ m, respectivamente. ◆ presença de promastigotas biflageladas em percentuais médios elevados (~55,0%), interpretadas como divisões estagnadas e consideradas de valor diagnóstico. ◆ paramastigotas em taxas médias ~0,5%. ◆ opistomastigotas muito raras (média ~0,05%). ◆ cinetoplasto volumoso com formato peculiar em todos os estágios ◆ comprimento do flagelo usualmente maior que o do corpo em todos os estágios. ◆ formas com flagelo intracelular enrolado raras e distintas das endomastigotas de outros gêneros. ◆ formas aflageladas ausentes ou muito raras. ◆ ausência de formas espiraladas. ◆ ausência de células semelhantes a um "sino", "jarro" ou "chupeta" ◆ divisão no estágio de promastigota e com núcleos principalmente em diferentes planos.

- ◆ **Dimensões médias em meio LIT 20% SFB (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflagelados (72 h); opistomastigotas (48–72 h).

Estágios	C (μ m)	L (μ m)	C/L	F (μ m)	IN
promastigotas (mono)	23,4	2,2	10,6	28,3	1,0
promastigotas (biflag)	25,9	2,4	10,7	29,2	1,0
paramastigotas (mono)	14,1	2,7	5,3	19,6	1,6
opistomastigotas	11,5	2,9	4,1	17,3	1,4

(**mono**) formas monoflageladas, (**biflag**) formas biflageladas.

- ◆ **Hospedeiros:** insetos dípteros (Muscidae e Calliphoridae) de diversos gêneros.
- ◆ **Espécie-tipo:** *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880
- ◆ **Espécie analisada e incluída no gênero:** *Herpetomonas muscarum ingenoplastis* (ATCC 30259, CT-IOC 021), a qual deve ser chamada simplesmente de *H. muscarum* e utilizada como referência. Única espécie disponível em cultura.
- ◆ **Notas:** A alta frequência de formas biflageladas em *H. muscarum* é de fato de grande valor diagnóstico para o gênero (*sensu* Prowazek 1904), mas outras peculiaridades também o são, conforme citadas na diagnose. Veja as características originais desta espécie no Anexo 7.4.2. A amostra aqui citada está depositada na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, ela foi classificada no **grupo H 1**.

4.7.6. Gênero *Cercoplasma* Roubaud, 1911 (revisto)

- ◆ **Características gerais:**
 - ◆ crescimento extremamente difícil, exigindo LIT 20% SFB (~1.300 células/ μ l; média entre 48–144 h).
 - ◆ promastigotas predominantes (média ~50,0%).
 - ◆ paramastigotas em taxas médias elevadas (~38,0%).
 - ◆ média do comprimento do corpo das promastigotas e paramastigotas ~17,0 μ m (não inclui formas "gigantes").
 - ◆ opistomastigotas presentes (~1,0%).
 - ◆ presença de células aflageladas alongadas, com uma ou mais torções no corpo, cinetoplasto ante- ou paranuclear, comprimento semelhante ao das formas flageladas, e a extremidade anterior truncada; livres ou aderidas entre si.
 - ◆ taxas muito altas de células espiraladas (~88,0%).
 - ◆ ocorrência de dois tipos celulares distintos, um deles com a porção anterior arredondada (geralmente contendo o núcleo) e a posterior gradualmente afilada, podendo ter uma ou mais torções no corpo, enquanto o outro tipo incluía promastigotas finas, espiraladas, alongadas, e também, embora raramente, "gigantes" (~70–200 μ m), estas de grande valor diagnóstico.
 - ◆ ausência de células tipo "sino" ou "jarro" e de "cistos" flagelares.
 - ◆ divisão, principalmente, como promastigota e com os núcleos em diferentes planos.

- ◆ **Dimensões médias em meio LIT 20% SFB (dados do presente trabalho):** estágios flagelados e aflagelados (72 h), exceto opistomastigotas (72–120 h).

Estágios	C (μ m)	L (μ m)	C/L	F (μ m)	IN
promastigotas (•)	17,2	2,8	6,6	10,1	2,8
paramastigotas (•)	17,3	3,0	6,0	8,5	4,1
opistomastigotas	10,9	2,7	4,1	10,0	2,5
aflageladas (ante)	18,1	2,5	7,5	-----	3,2
aflageladas (para)	17,4	2,6	7,2	-----	4,4

(•) dados de amostragens ao acaso, sem considerar o dimorfismo destes estágios ou incluir formas gigantes. (**ante**) cinetoplasto antenuclear, (**para**) cinetoplasto paranuclear.

Dados de uma forma gigante: C= 80 μ m; L= 1,8 μ m; C/L= 44,4; F= 12,5 μ m; IN= 3,2.

- ◆ **Hospedeiros:** insetos dípteros muscóides.
- ◆ **Espécie de referência** (sugerida): *Cercoplasma mirabilis* (Roubaud, 1908) Roubaud, 1911.
- ◆ **Espécie incluída no gênero:** *Cercoplasma mirabilis* (= *L. mirabilis*; ATCC 30263, CT-IOC 024).
- ◆ **Notas:** Outras espécies que apresentam formas "gigantes" têm sido descritas por diversos autores e foram consideradas muito semelhantes por Wallace (1966), entre elas "*L.*" *gracilis*. Entre todas as espécies analisadas, *L. mirabilis* foi a que apresentou crescimento mais difícil. *L. costoris* apresenta a forma do corpo semelhante a um dos tipos encontrados em *L. mirabilis*, mas suas afinidades precisam ser avaliadas por outras abordagens. A amostra de *L. mirabilis* aqui utilizada está depositada na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, foi classificada no **grupo L 5**.

4.7.7. Gênero *Phytomonas* Donovan, 1909 (revisto)

- ◆ **Características gerais:** ◆ crescimento muito variável (~900–28.000 células/ μl ; médias entre 48–144 h), em algumas espécies sendo razoável ou bom em meio LIT e, em outras, difícil ou extremamente difícil, podendo exigir LIT 20% SFB. ◆ promastigotas absolutamente predominantes, com acentuada variação no tamanho do flagelo e, em algumas espécies, do corpo também, com taxas de formas espiraladas variáveis e superiores a 30,0%, médias do comprimento do corpo e do flagelo variando, respectivamente, entre ~10,0–22 μm e ~8,0–26 μm . ◆ processo de divisão muito peculiar, que pode originar células com flagelos de tamanhos muito diferentes, ou uma forma flagelada e a outra não; caráter de grande valor diagnóstico. ◆ ocorrência de promastigotas sem flagelo livre, alongadas, com as extremidades afiladas ou levemente arredondadas, geralmente menores que as flageladas, em taxas médias muito variáveis (~1,0–53,0%), com médias do comprimento do corpo entre ~8,0–16,0 μm , as quais nunca ocorrem agregadas, mas podem ser vistas em divisão. ◆ em algumas amostras, observou-se o alargamento gradual do corpo com o tempo de cultivo, com surgimento de formas elípticas ou arredondadas, cujo flagelo, total ou parcialmente, parecia aderido ao parasita. ◆ aumento gradual, tanto do comprimento do corpo quanto do flagelo, mas não da largura, observado durante o cultivo de uma espécie.
- ◆ **Dimensões médias em meio LIT ou LIT 20% SFB (dados do presente trabalho):** estágios de promastigotas, com ou sem flagelo livre (72 h).

Estágios	C (μm)	L (μm)	C/L	F (μm)	IN
promastigotas flageladas	10,3–21,9	1,4–2,3	6,4–12,0	7,6–25,6	1,3–2,7
promastigotas aflageladas	7,7–15,5	1,3–2,0	5,8–7,9	-----	1,3–2,1

- ◆ **Hospedeiros:** vegetais e insetos fitófagos
- ◆ **Espécie-tipo:** *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909.
- ◆ **Espécies analisadas e incluídas no gênero:** *Phytomonas serpens*, *P. macgheei*, *P. francai*, *Phytomonas* sp. (C.b.), *Phytomonas* sp. (A.c.), *Phytomonas* sp. (E.p.), *Phytomonas* sp. (E.c.) e *Phytomonas* sp. (J.m.).
- ◆ **Notas:** Confirmamos que as amostras aqui analisadas têm características da espécie-tipo, *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909 (ver Anexo 7.4.6), e que o isolado de McGhee & Postell (1976) foi erroneamente identificado como sendo a mesma, mas posteriormente classificado como *Herpetomonas* (**grupo H 2**). Assim sendo, *P. davidi* é uma espécie distinta de *H. davidi* (ATCC 30287; CT-IOC 077). Todas as amostras analisadas estão depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. No presente estudo, foram classificadas no **grupo P 1**.

TABELA XXVII
CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS ISOLADOS DE INSETOS OU PLANTAS

Morfobiodemas	Grupo C 1	Grupo C 2	Grupo C 3	Grupo C 4	Grupo H 1		Grupo H 2		GRUPO P 1
Espécies consideradas	Gênero <i>Crithidia</i> C. fasciculata (2) [C 1a] (+) (•) (••) (▲) C. guilhermeti [C 1a] (+) (•) (••) (▲) C. luciliae [C 1a] (+) (•) (••) (▲) C. ricardoi [C 1a] (+) (•) (••) (▲) Crithidia sp. (C.t.) [C 1a] (▲) C. flexonema [C 1b] (+) (•) (••) (▲) C. mellificae [C 1c] (+) (•) (••) (▲) C. hutneri [C 1c] (•) (••) (▲) Crithidia sp. (Z.I.) [C 1c] (▲) C. hamosa [C 1d] (+) (•) (••) (▲)	Gênero <i>Wallaceina</i> W. inconstans (+) (•) (••) (▲) W. brevicula (+) (•) (••)	Gênero <i>Angomonas</i> A. deanae (+) (••) A. desouzai (+) (••) A. roitmani (+) (••)	Gênero <i>Strigomonas</i> S. oncopelti (+) (••)	Gênero <i>Herpetomonas</i> (sensu Prowazek 1904) H. muscarum =H. muscarum ingenoplastis (+) (■) (◊)	Gênero "<i>Herpetomonas</i>" (?) H. muscarum muscarum [H 2a] (+) (••) (▲) H. megaseliae [H 2a] (+) (▲) H. davidi [H 2a] (+) (•) (••) (▲) Herpetomonas sp (E.h.) [H 2a] (+) (▲) Herpetomonas sp. (S.I.) [H 2a] (+) (▲) Herpetomonas sp. (L.s.) [H 2a] (+) (▲) H. mariadeanei [H 2b] (+) (•) (▲) (◊) H. pessoai [H 2c] (+) (▲) H. anglusteri [H 2c] (+)		Gênero <i>Phytomonas</i> P. serpens [P 1a] (•) (••) Phytomonas sp. (C.b.) [P 1a] (•) P. macgheeii [P 1b] (•) Phytomonas sp. (A.c.) [P 1c] (•) (••) Phytomonas sp. (E.p.) [P 1d] (•) Phytomonas sp. (E.c.) [P 1e] (■) (•) P. francai [P 1b] (■) (•) Phytomonas sp. (J.m.) [P 1b] (•)	
	Meio de cultivo	LIT	LIT	LIT	LIT	LIT 20% SFB (■)		LIT	
Crescimento (*)	bom ou muito bom	bom	excelente	bom	extremamente difícil (■)		bom ou muito bom		razoável-extremamente difícil (■)
Estágios (nº) (**)	7-11	9-10	7-9	6	4		4-7		3-5
Estágios predominantes	procoanomastigotas e/ou paracoanomastigotas	endocoanomastigotas	metacoanomastigotas	paracoanomastigotas	promastigotas		promastigotas		promastigotas
(F) promastigotas ou procoanomastigotas	19,9-78,0%	5,2-12,9%	0,4-3,9%	1,7%	94,1%		64,4-96,8%		90,6-98,9%
(F) paramastigotas ou paracoanomastigotas	15,0-75,8%	27,1-31,2%	8,3-24,6%	77,6%	0,5%		1,1-30,5%		ausentes
opistomastigotas ou metacoanomastigotas	presentes (+) 0,04-0,7%	presentes (+) 0,08-0,6%	presentes (+) 55,4-67,4%	presentes (+) 5,1%	presentes (+) 0,04%		presentes (+) 0,04-3,9%		ausentes
endomastigotas ou endocoanomastigotas	presentes (8/11) (Tab. VI) 0,1-2,3%	presentes (Tab. VI) 53,7-64,0%	presentes (Tab. VI) 0,08-0,4%	ausentes	presentes (tipo peculiar, Fig. 15 B) 0,1%		presentes (4/9) (Tab. VII) 0,08-1,9%		ausentes
Biometria: (F) promastigotas ou procoanomastigotas	7,2-10,6µm (C) 2,9-4,3 (C/L) 0,7-1,4 (IN)	9,2-9,6µm (C) 3,8 (C/L) 0,9-1,4 (IN)	5,4-7,2µm (C) 2,6-3,5 (C/L) 0,5-0,9 (IN)	8,5µm (C) 2,9 (C/L) 1,0 (IN)	Monoflageladas 23,4µm (C) 10,6 (C/L); 1,0 (IN)	Biflageladas 25,9µm (C) 10,7 (C/L) 1,0 (IN)	Grupos H 2a,b 11,5-16,0µm (C) 6,2-9,1 (C/L) 1,0-1,7 (IN)	Grupo H 2c 9,3-10,6µm (C) 3,6-4,3 (C/L) 1,0 (IN)	10,3-21,9µm (C) 6,4-12,0 (C/L) 1,3-2,7 (IN)
(A) promastigotas ou procoanomastigotas	presentes (•) 0,04-3,6% (livres ou aderidas)	presentes (•) 0,3% (livres ou aderidas)	ausentes	ausentes	ausentes		presentes (2/9) (•) 0,02-0,04% (livres)		presentes (•) 0,8-52,5% (livres)
(A) paramastigotas ou paracoanomastigotas	presentes (••) 0,2-6,6% (livres ou aderidas)	presentes (••) 1,7-3,7% (livres ou aderidas)	presentes (••) 0,4-1,6% (livres)	presentes (••) 0,4% (livres)	ausentes		presentes (2/9) (••) 0,02-0,04% (livres)		presentes (2/9) (••) 0,04-0,06% (livres)
Biometria: (A) promastigotas ou procoanomastigotas	5,6-7,2µm (C) 2,0-2,5 (C/L); 0,3-0,7(IN)	6,1-6,2µm (C) 2,6 (C/L); 0,4 (IN)	-----	-----	-----		-----		8,8-15,5µm (C) 5,8-7,9 (C/L); 1,3-2,1 (IN)
Biometria: (A) paracoanomastigotas	5,2-7,3µm (C) 1,9-2,8 (C/L); 0,4-0,8 (IN)	5,5-6,0µm (C) 2,3-2,4 (C/L) 0,4 (IN)	4,7-5,1µm (C) 1,8-2,3 (C/L) 0,5-0,7 (IN)	8,7µm (C) 3,0 (C/L) 1,3 (IN)	-----		-----		-----
Céls "sino"/"jarro"	presentes (▲)	presentes (1/2) (▲)	ausentes	ausentes	Ausentes		presentes (8/9) (▲)		ausentes
Céls biflageladas (◊)	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	presentes (◊) (55,1%)		presentes (1/9) (◊) (0,4%)		ausentes
Céls espiraladas	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	muito raras (✕)		raras ou mais frequentes (✕)		33,2-77,5%
Tipos divisão (***)	3-4	4-6	3-5	5	2		3-4		1

(F) formas flageladas. (A) formas aflageladas. (*) ver item 3.1. (**) inclui divisões, mas não os estágios com taxas < 0,1%. (***) considerando-se a posição do(s) cinetoplasto(s) em relação aos núcleos e a presença divisões com flagelo curvado intracelularmente. (◊) com 1 núcleo e 1 cinetoplasto, estes sem sinais de divisão ao M.O. (ante) antenuclear; (para) paranuclear; (pos) posnuclear. (Céls) células. (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre; (C/L) razão comprimento/largura; (IN) índice nuclear (os valores citados representam as médias). (✕) percentuais não determinados. Ver lista de abreviaturas: (C.t.), (Z.I.), (E.h.), (S.I.), (L.s.), (C.b.), (A.c.), (E.p.), (E.c.), (J.m.).

TABELA XXVIII
CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS PREVIAMENTE IDENTIFICADOS COMO LEPTOMONAS

Morfobiódemas	Grupo L 1	Grupo L 2	Grupo L 3	Grupo L 4	Grupo L 5	Grupo L 6		Grupo L 7	
Espécies consideradas	<i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-1) [L 1a] (◊) <i>Leptomonas</i> sp. (L.a.-2) [L 1a] (◊) <i>L. pyrrocoris</i> [L 1b] <i>L. seymouri</i> [L 1b] <i>L. collosoma</i> [L 1c] (•) (••) (▲)	<i>L. samueli</i> (+) (•) (••)	<i>L. lactosovorans</i> (+) (•) (••)	<i>L. costoris</i> (•) (••) (◊)	Gênero <i>Cercoplasma</i> <i>C. mirabilis</i> (■) (+) (•) (••) (◊) (⊕)	<i>L. pulexsimulantis</i> (+) (•) (••)	<i>L. wallacei</i> (L 7a) (•) (••) <i>Leptomonas</i> sp. (O.v.) [L 7b] (■) (•) (••)		
Meio de cultivo	LIT	LIT	LIT	LIT	LIT 20% SFB (■)	LIT		LIT ou LIT 20% SFB (■)	
Crescimento (*)	razoável a excelente	bom	bom	difícil	extremamente difícil (■)	muito difícil		razoável e extremamente difícil (■)	
Estágios (nº) (**)	2-4	4	8	5	7	7		3-5	
Estágios predominantes	promastigotas	promastigotas	promastigotas	promastigotas	promastigotas e paramastigotas	promastigotas		promastigotas	
(F) promastigotas	90,9-98,2%	97,7%	93,5%	82,7%	50,4%	72,6%		94,7-95,8%	
(F) paramastigotas	0,08-5,3%	0,6%	4,3%	3,4%	38,2%	23,5%		0,08-2,3%	
opistomastigotas	ausentes	presentes (+) 0,08%	presentes (+) 0,2%	ausentes	presentes (+) 1,2%	presentes (+) 0,2%		ausentes	
endomastigotas	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes		ausentes	
Biometria: (F) promastigotas	12,5-14,0µm (C) 5,6-9,3 (C/L) 1,3-1,9 (IN)	18,7µm (C) 8,7 (C/L) 1,6 (IN)	12,0µm (C) 5,4 (C/L) 1,1 (IN)	17,7µm (C) 5,6 (C/L) 2,1 (IN)	17,2µm (C) 6,6 (C/L) 2,8 (IN)	Tipo 1 14,0µm (C) 7,3 (C/L) 1,9 (IN)	Tipo 2 11,3µm (C) 3,7 (C/L) 1,8 (IN)	Tipo 3 14,0-16,9µm(C) 6,3-8,0 (C/L) 1,1-1,5 (IN)	Tipo 4 11,2-13,4µm(C) 3,5-4,1 (C/L) 0,5-0,7 (IN)
(A) promastigotas(⊛)	presentes (•) 0,08% (livres)	presentes (•) 0,1% (livres)	presentes (•) 1,2% (livres)	presentes (•) 2,8% (livres ou aderidas)	presentes (•) 0,9% (livres ou aderidas)	presentes (•) 3,5% (livres ou aderidas)		presentes (•) 0,6-2,4% (livres ou aderidas)	
(A) paramastigotas (⊛)	presentes (••) 0,04% (livres)	presentes (••) 0,08% (livres)	presentes (••) 1,5% (livres)	presentes (••) 0,7% (livres ou aderidas)	presentes (••) 0,3% (livres ou aderidas)	presentes (••) 2,3% (livres ou aderidas)		presentes (••) 0,04-0,3% (livres ou aderidas)	
Cistos flagelares	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	presentes (raros)		presentes (raros)	
Biometria: (A) promastigotas (⊛)	-----	12,4µm (C) 5,5 (C/L); 1,4 (IN)	11,3µm (C) 5,1 (C/L); 1,2 (IN)	17,9µm (C) 5,4 (C/L); 2,0 (IN)	18,1µm (C) 7,5 (C/L); 3,2 (IN)	10,7µm (C) 3,8 (C/L); 1,5 (IN)		13,7-15,4µm (C) 6,4-7,0 (C/L); 1,4-1,5 (IN)	
Biometria: (A) paramastigotas (⊛)	-----	-----	10,1µm (C) 4,6 (C/L); 1,3 (IN)	17,1µm (C) 4,9 (C/L); 2,4 (IN)	17,4µm (C) 7,2 (C/L); 4,4 (IN)	10,5µm (C) 3,7 (C/L); 1,6 (IN)		<i>(L. wallacei)</i> : 11,1µm (C) 4,8 (C/L); 1,5 (IN)	
Céls "sino"/"jarro"	presentes (▲)	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes		ausentes	
Céls biflageladas (◊)	presentes (◊) (0,2-0,8%)	ausentes	ausentes	presentes (◊) 3,4%	presentes (◊) 1,0%	ausentes		ausentes	
Céls espiraladas	raras ou mais freqüentes (✕)	presentes (✕)	raras (✕)	72,8%	88,3%	28,0%		27,9-54,4%	
Tipos divisão (***)	3	3	2	3	2	4		2	

(F) formas flageladas. (A) formas aflageladas. Grupos L 1 a L 7 reúnem espécies previamente classificadas como *Leptomonas*. (*) ver item 3.1. (**) inclui divisões, mas não estágios com taxas < 0,1%. (***) tipos de divisão considerando-se a posição do(s) cinetoplasto(s) em relação aos núcleos e a presença divisões com flagelo curvado intracelularmente. (⊛) sem características de cistos flagelares. (◊) com 1 núcleo e 1 cinetoplasto, estes sem sinais de divisão ao M.O. (ante) antenuclear; (para) paranuclear; (pos) posnuclear. (Céls) células. (C) comprimento do corpo sem o flagelo livre; (C/L) razão comprimento/largura; (IN) índice nuclear (os valores citados representam as médias). (✕) percentuais não determinados. (⊕) apresenta dimorfismo de promastigotas e paramastigotas (tipos não discriminados na amostragem, a qual também não incluiu células "gigantes"). Ver a lista de abreviaturas: (O.v.), (L.a.-1) e (L.a.-2).

4.8. Fenômenos sugestivos de sexualidade em tripanosomatídeos isolados de insetos e plantas

Confirmamos que nos tripanosomatídeos podem ocorrer fenômenos que possibilitam contatos entre células e seus núcleos (condição básica para o início de um intercâmbio genético), tal como descrevemos e discutimos amplamente em diversos trabalhos anexados a esta tese (Sousa 1994a, 1997, Sousa *et al.* 1995, 1997a, b; Anexos 7.1).

No presente estudo, pares e células peculiares também foram encontradas ou confirmadas em diversas espécies, estas previamente classificadas nos gêneros *Crithidia* (Fig. 25), *Herpetomonas* (Figs 26, 27), *Leptomonas* (Fig. 28 A–C) e *Phytomonas* (28 D, E) (Tabela XXVI). Embora não possamos associar a ocorrência destas formas a um grupo taxonômico, encontramos com maior frequência eventos sugestivos de migração e fusão de núcleos nas chamadas *Herpetomonas* (aqui classificadas no grupo **H 2**). Assinalamos que, possivelmente, o primeiro registro de células tipo jarro foi feito Novy *et al.* (1907; ver Anexo 7.4.1, pancha 9, figura 4), enquanto a primeira descrição de células tipo "sino" foi feita por Wallace (1962).

Em duas amostras cistogênicas que estudamos, *L. wallacei* e *Leptomonas* sp. (O.v.), encontramos células semelhantes a uma "raquete" ou modificadas na extremidade posterior (Figs 21, 28 B, C; ►). Supomos que tais células possam ter alguma relação com a formação de pares apostos nestas espécies (Fig. 28 B; cabeça de seta); nestas amostras não ocorrem células do tipo "sino", "jarro" ou "chupeta".

Com base no conjunto de trabalhos já publicados (Anexo 7.1) e nos achados do presente estudo (Figs 25–28), foram feitas representações esquemáticas (Figs 29, 30) de possíveis seqüências de eventos para os fenômenos sugestivos de sexualidade observados em tripanosomatídeos. Nestes esquemas foram incluídos quatro tipos de interações celulares (Figs 29 B, C; 30 B, C), além das células peculiares que parecem relacionadas como tais interações.

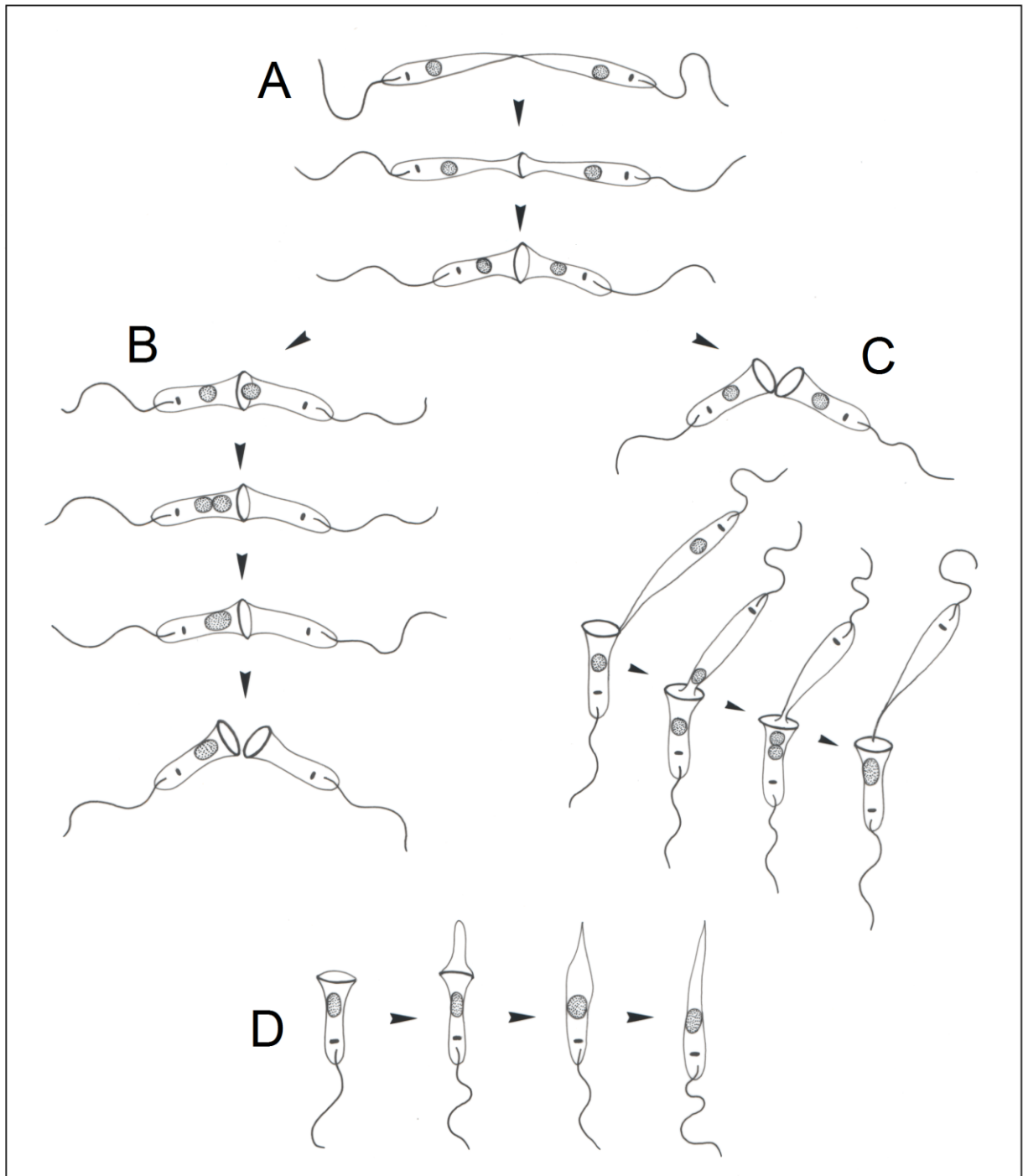


Figura 29: Representação esquemática de propostas de seqüências de eventos sugestivos de sexualidade descritos por Sousa (1994) e Sousa *et al.* (1997a, b) e também observados no presente estudo em espécies de *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Phytomonas* (Figs 25–28; Tabela XXVI). **(A)** Duas promastigotas (ou outro estágio) tocam-se pelas extremidades posteriores ficando apostas; no ponto de contato podem tornar-se alargadas e surgir uma "linha" (às vezes, semelhante a um "anel"). **(B)** O núcleo de uma célula migra em direção ao da outra, estes podendo ficar muito próximos e, em certos pares, aparentemente fundidos. A seguir, o par desfaz-se, liberando células semelhantes a "sino"/"jarra", uma com núcleo volumoso e a outra anucleada. **(C)** Pode ocorrer separação de células unidas como na Fig. A sem que a migração de núcleos tenha havido; com isto liberam-se formas semelhantes a "sinos"/"jarras" com núcleo de tamanho normal. Uma promastigota (às vezes muito alongada), através de sua extremidade posterior, entra em contato com uma destas células "sino"/"jarra" e transfere seu núcleo para ela; nesta pode ocorrer o encontro e aparente fusão nuclear. Após, o par desfaz-se, também liberando uma célula "sino"/"jarro" com núcleo volumoso e uma forma afilada sem núcleo. **(D)** As células "sino"/"jarra" parecem gradualmente reassumir a forma original.

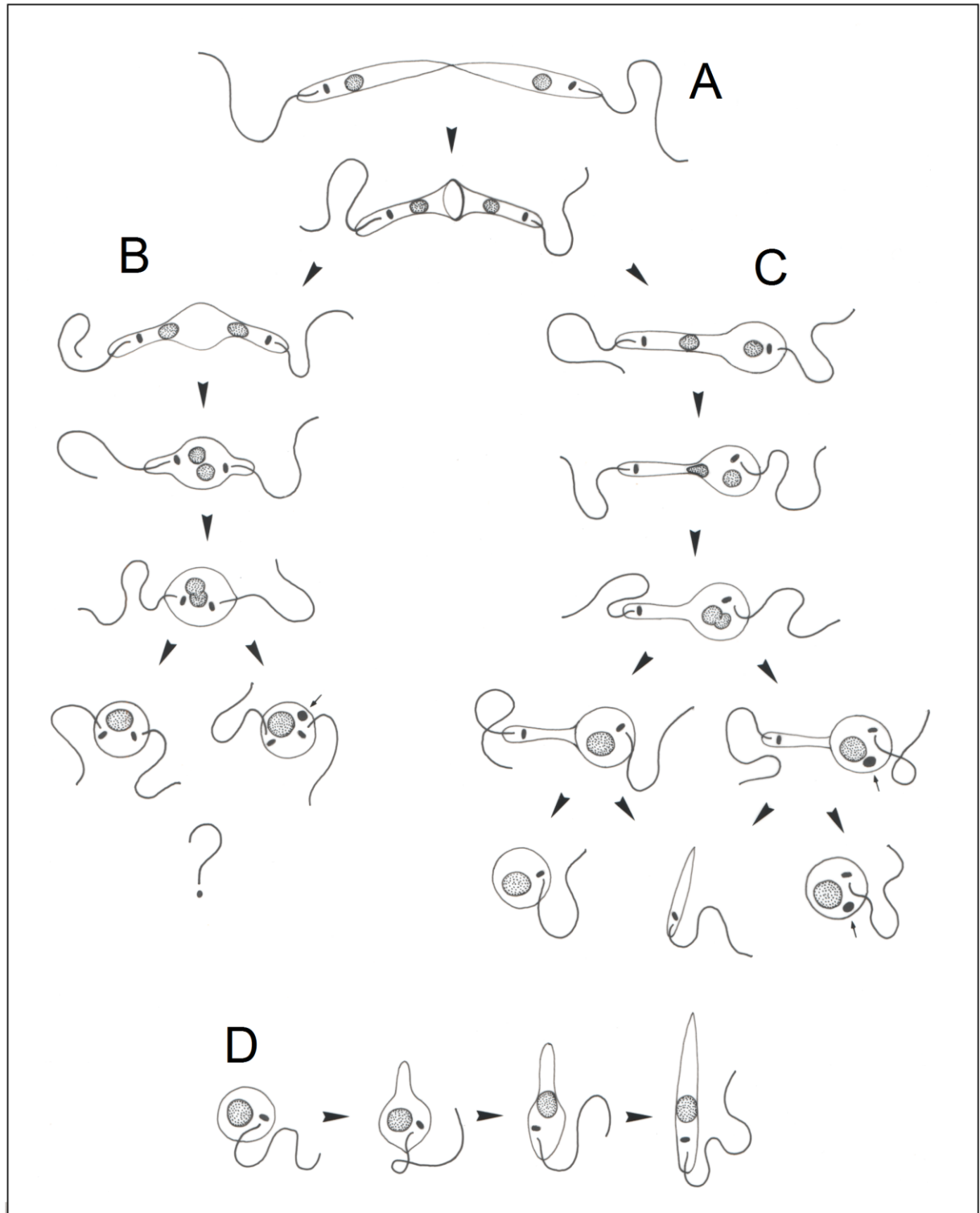


Fig. 30. Representação esquemática de propostas de seqüências de eventos para os achados sugestivos de sexualidade descritos por Sousa (1997) em *Herpetomonas davidi* (isolado de McGhee & Postell, 1976). **(A)** Duas promastigotas tocam-se pelas extremidades posteriores ficando apostas; na região de contato surge uma "linha" (às vezes semelhante a um "anel") e inicia-se o alargamento do corpo. **(B)** A "linha" desaparece e o alargamento prossegue abrangendo as células do par, o qual gradualmente torna-se globoso. Concomitantemente, o núcleo de cada célula migra para a região globosa, nela tornando-se próximos e, em alguns pares, aparentemente fundidos. Ao final do processo, forma-se uma célula redonda, biflagelada e com o núcleo grande, o qual em vários casos fica acompanhado de um corpúsculo denso (?); o destino destas células ainda não pôde ser interpretado. **(C)** Em outros pares, a dilatação globosa ocupa apenas uma das células; nela também os núcleos encontram-se e aparentemente fundem-se. O processo termina com a separação das células, uma sendo afilada e sem núcleo e outra redonda, monoflagelada, tendo o núcleo volumoso, acompanhado ou não de um corpúsculo denso. **(D)** Estas células redondas monoflageladas parecem que gradualmente reassumem a forma promastigota.

5. CONCLUSÕES

- ◆ A análise biológica, morfológica e biométrica comparativa de cinquenta amostras de tripanosomatídeos isolados de insetos ou plantas forneceu dados importantes para a classificação da maioria em catorze grupos (morfbiodemas), sete dos quais puderam ser identificados com gêneros já propostos, com uma revisão de sua diagnose: *Crithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Herpetomonas* (*sensu* Prowazek), *Cercoplasma* e *Phytomonas*,
- ◆ O presente estudo confirmou que é possível identificar e classificar tripanosomatídeos por abordagens parasitológicas clássicas, desde que se considere o conjunto de seus caracteres, estes sendo conhecidos por análises em condições experimentais padronizadas em todos aspectos possíveis, com a inclusão de amostras de referência. Também é importante a padronização dos parâmetros biométricos a serem utilizados, incluindo o cálculo de índices. As observações morfológicas básicas devem ser feitas em lâminas coradas pelo Giemsa tamponado, após hidrólise ácida, utilizando-se microscopia óptica com objetiva de imersão (1.000×).
- ◆ A classificação das amostras aqui analisadas em um número maior de grupos que o de gêneros existentes, confirma que estes são insuficientes para representar a real diversidade da família Trypanosomatidae.
- ◆ Para melhor definir os diferentes estágios evolutivos observados em amostras com a forma coanomastigota, propusemos denominá-los de procoanomastigotas, paracoanomastigotas e metacoanomastigotas, respectivamente, quando seu cinetoplasto apresentava posição antenuclear, paranuclear e posnuclear. Os estágios com flagelo curvado intracelularmente foram chamados de endocoanomastigotas.
- ◆ Evidenciou-se que o processo de divisão pode originar células com estágios evolutivos distintos, como também que podem ocorrer divisões de formas altamente diferenciadas, conforme descritas em metacoanomastigotas, aqui observadas em endocoanomastigotas.
- ◆ Em relação à intensidade de crescimento em cultura axênicas, observou-se uma certa homogeneidade em alguns grupos e uma grande variação em outros. O gênero *Angomonas* e duas espécies previamente identificadas como *Crithidia* apresentaram os maiores valores médios de crescimento ($\sim 10^5$ células/ μ l), enquanto os menores foram observados na chamada "*Leptomonas*"

mirabilis e em uma amostra de *Phytomonas* ($\sim 10^3$ células/ μl). Os dados sobre o crescimento de um isolado podem auxiliar em decisões sobre sua classificação em grupos ou gêneros.

- ◆ Constatou-se a grande diversidade, além da complexidade de estágios evolutivos, encontrada em tripanosomatídeos com a forma coanomastigota, os quais foram aqui reunidos em quatro grupos, correspondendo a gêneros conhecidos: **grupo C 1:** *Crithidia* Léger, 1902 (*sensu* Novy *et al.* 1907 e Wallace 1943); **grupo C 2:** *Wallaceina* (Podlipaev *et al.*, 1990); **grupo C 3:** *Angiomonas* Sousa & Côrte-Real, 1991; **grupo C 4:** *Strigomonas* Lwoff & Lwoff, 1931.
- ◆ As formas mais típicas vistas no gênero *Crithidia* foram as pequenas coanomastigotas ($\sim 7\mu\text{m}$) geralmente sem flagelo livre, com núcleo próximo da extremidade posterior do corpo (usualmente arredondada), cinetoplasto paranuclear e a extremidade anterior mais alargada, a qual cora mais intensamente pelo Giemsa. Estas formas podem ser encontradas livres ou aderidas entre si (haptomonas), formando pares, grupos ou rosetas (ver Anexo 7.4.1). É possível distinguir as espécies de *Crithidia* de outros gêneros com coanomastigotas, porque nelas as metacoanomastigotas ou endocoanomastigotas são ausentes ou só ocorrem em taxas médias baixas ($\leq 2,3\%$).
- ◆ *C. luciliae thermophila*, *C. acanthocephali* e a chamada "*H.*" *dedonderi*, apesar de compartilharem caracteres com espécies do gênero *Crithidia*, foram consideradas *incertae sedis* até que análises bioquímicas e moleculares possam melhor definir suas afinidades taxonômicas.
- ◆ Confirmamos que a chamada *C. luciliae thermophila* não é subespécie de *C. luciliae* e evidenciamos que as duas variedades de *C. fasciculata* analisadas (cepas *Anopheles* e *Culex*) poderiam ser reconhecidas como espécies separadas ou, pelo menos, identificadas como subespécies.
- ◆ A predominância de metacoanomastigotas ($> 55,0\%$) ou endocoanomastigotas ($> 50\%$) revelou-se de grande valor diagnóstico, respectivamente, para os gêneros *Angomonas* e *Wallaceina*. Em *Strigomonas*, predominaram as paracoanomastigotas, mas as endocoanomastigotas e haptomonas aflageladas foram ausentes, enquanto as metacoanomastigotas ocorreram em taxas baixas ($\sim 5,0\%$).
- ◆ Confirmou-se que, nas amostras que possuem endossimbionte (*Angomonas* e *Strigomonas*), o processo de diferenciação celular que gera estágios com cinetoplasto posnuclear não depende da presença do mesmo.
- ◆ Na literatura, há registros de organismos muito distintos identificados como *H. muscarum*, espécie-tipo do gênero *Herpetomonas*. De acordo com as descrições e ilustrações de diversos autores pioneiros, entre as chamadas *Herpetomonas* que analisamos, apenas a chamada *H. muscarum ingenoplastis* era semelhante à espécie-tipo, pois possuía promastigotas de dimensões

avantajadas, geralmente biflageladas, cinetoplasto volumoso e com formato peculiar (ver Anexo 7.4.2). Assim, esta amostra deve ser chamada apenas de *H. muscarum*, tendo sido considerada de referência (ATCC 30259; CT-IOC 021) para a revisão da diagnose do gênero *Herpetomonas*. No presente trabalho, esta espécie foi classificada no **grupo H 1**.

- ◆ Diante das nossas observações, além de dados da literatura, as sub-espécies *H. muscarum muscarum* e *H. m. ingenoplastis* não podem ser consideradas válidas.
- ◆ As demais espécies também identificadas como *Herpetomonas* são muito distintas da verdadeira *H. muscarum* (= *H. m. ingenoplastis*) e aqui foram classificadas **grupo H 2**. Assim, faz-se necessário um novo nome genérico para este grupo.
- ◆ Uma característica curiosa observada nas *Herpetomonas* aqui analisadas foi a total ausência (ou quase) de promastigotas e paramastigotas aflageladas, como também de formas espiraladas.
- ◆ Estágios com cinetoplasto posterior ao núcleo (opistomastigotas ou metacoanomastigotas) podem ocorrer em espécies de diferentes gêneros e, isoladamente, seu encontro não deve ser considerado de valor diagnóstico, como aconteceu durante quase um século para a identificação do gênero *Herpetomonas*.
- ◆ Até o presente, ainda é difícil definir a diagnose do gênero *Leptomonas* e confirmar sua existência, com base nas incertezas sobre a autenticidade de sua espécie-tipo (*L. bütschlii*). Entretanto, entre as amostras estudadas, duas espécies cistogênicas isoladas de insetos fitófagos apresentaram similaridade com o primeiro isolado de inseto identificado como *Leptomonas* (*L. jaculum*).
- ◆ No presente estudo confirmamos a grande heterogeneidade dos organismos que têm sido identificados como *Leptomonas* e, assim sendo, estes foram classificados em sete grupos, identificados como **L 1–L 7**.
- ◆ Entre as chamadas *Leptomonas*, aquelas de organização mais simples, não apresentando formas aflageladas (ou estas eram raríssimas), nem opistomastigotas e "cistos" flagelares, foram reunidas no **grupo L 1**.
- ◆ Nossos resultados não evidenciaram claramente as afinidades de *L. samueli*, aqui classificada isoladamente no **grupo L 2**, com nenhuma das espécies classificadas como *Herpetomonas* (**grupo H 2**), conforme sugerido por alguns autores.
- ◆ As amostras cistogênicas identificadas como *Leptomonas* foram classificadas em grupos distintos por conta de suas peculiaridades. Em um deles (**grupo L 6**), foi incluída apenas a

chamada *L. pulexsimulantis*. No outro (**grupo L 7**), foram incluídos dois isolados de insetos fitófagos (*L. wallacei* e uma *Leptomonas* sp. obtida de *Oncopeltus varicolor*).

- ◆ A singular *L. mirabilis* foi classificada no **grupo L 5**, distinguindo-se das demais espécies estudadas por sua complexa combinação de caracteres: crescimento extremamente difícil em cultura axênica, altos percentuais de formas espiraladas, promastigotas predominantes, paramastigotas em percentuais elevados, opistomastigotas presentes (média: ~1,0%), ocorrência de formas aflageladas peculiares, presença de dois tipos celulares distintos, um deles com a porção anterior arredondada (contendo o núcleo) e a posterior gradualmente afilada, com uma ou mais torções, enquanto o outro tipo incluía promastigotas finas, alongadas, espiraladas e também, embora raramente, formas "gigantes" (~70–200µm) que são de grande valor diagnóstico.
- ◆ Para reclassificar *L. mirabilis*, propõe-se o resgate do gênero *Cercoplasma* Roubaud, 1911, no qual esta espécie já havia sido identificada, com uma revisão de sua diagnose, tendo como referência a amostra aqui analisada (ATCC 30263; CT-IOC 024).
- ◆ As espécies identificadas como *Phytomonas* apresentaram basicamente promastigotas, com percentuais variáveis de formas espiraladas. Entretanto, estas amostras compartilhavam algumas peculiaridades que facilitavam a sua distinção de espécies de outros gêneros, tais como: promastigotas com acentuada variação no tamanho do flagelo, presença de formas aflageladas alongadas, menores que as flageladas, e sem tendência à agregação, além de um processo de divisão típico, o qual podia originar duas células com flagelos de tamanhos muito diferentes, ou uma forma flagelada e a outra não.
- ◆ As amostras de *Phytomonas* estudadas foram reunidas em um só grupo (**P 1**), mas também apresentaram variabilidade inter-específica, em particular em relação à sua capacidade de crescimento em cultura axênica, além da ocorrência, em algumas espécies, de alargamento ou alongamento do corpo com o tempo de cultivo.
- ◆ Nossos resultados confirmaram que as espécies de *Phytomonas* aqui analisadas têm características em comum com a espécie-tipo do gênero, *P. davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909, mas que o isolado de McGhee & Postell (1976), apesar de ter sido identificado com esta espécie, apresenta características de *Herpetomonas* do **grupo H 2** e foi renomeado como *H. davidi*.
- ◆ Formas espiraladas não são de valor diagnóstico para a identificação de *Phytomonas*, pois também podem ser encontradas, inclusive em taxas muito elevadas, em algumas espécies com características diferentes e que foram classificadas como *Leptomonas*.

- ◆ Endomastigotas não foram encontradas nas amostras classificadas como *Leptomonas* e *Phytomonas*, enquanto nas chamadas *Herpetomonas* só foram vistas em algumas espécies e em taxas médias < 2,0%.
- ◆ Confirmamos que tripanosomatídeos com características de gêneros considerados monoxênicos, como *Crithidia* e *Herpetomonas*, podem ser isolados de vegetais. Estes organismos distinguem-se facilmente das espécies de *Phytomonas* por seus caracteres morfológicos. Entretanto, não há certeza se tais amostras são efetivamente parasitas de vegetais, neles cumprindo uma etapa de seu ciclo de vida, mesmo que opcional, ou se foram isoladas apenas por serem contaminantes fortuitos, procedentes de fezes de insetos infectados.
- ◆ No presente trabalho, foram encontrados ou confirmados problemas com a nomenclatura de algumas espécies. Assim sendo, *H. samuelpeessoai* deve ser apropriadamente chamada de *H. pessoai*. O nome genérico *Angomonas* deve ser corretamente latinizado como *Angiomonas*. Os nomes de espécies em homenagem a uma mulher devem receber a terminação "ae", como *A. deanae* (= "*Crithidia*" *deanei*) e *H. mariadeanae*.
- ◆ Confirmou-se que nos tripanosomatídeos de insetos e plantas podem ocorrer eventos que possibilitam contatos entre células e seus núcleos, os quais sugerem fenômenos de sexualidade. Estes também foram encontrados em espécies classificadas nos gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Phytomonas*, mas principalmente nas chamadas *Herpetomonas* do **grupo H 2**, as quais apresentaram maior freqüência de formas sugestivas de migração e fusão de núcleos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu-Filho BA, Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Santos RL 1994. Surface proteins in *Phytomonas* and other lower trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 245.
- Acosta L, Romanha AJ, Cosenza H, Krettli AU 1991. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg* 44: 676-683.
- Adler S 1963. Differentiation of *Leishmania brasiliensis* from *L. mexicana* and *L. tropica*. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (México)* 23: 139-152.
- Ahomadegbe JC, Dollet M, Coulaud D, Gargani D, Riou G 1990. Kinetoplast DNA permits characterization of pathogenic plant trypanosomes of economic importance. *Biol Cell* 70: 167-176.
- Ahomadegbe JC, Dollet M, Riou G 1992. Kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for the Hartrot disease in coconut trees. *Biol Cell* 74: 273-279.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1989. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed., Garland Publishing, New York & London, 1218 pp.
- Alexeieff A 1911. Sur les cercomonadines intestinales de *Calliphora erythrocephala* Mg et de *Lucilia* sp. *C R Soc Biol* 71: 379-382.
- Alfieri SC, Camargo EP 1982. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. *Exp Parasitol* 53: 371-380.
- Almeida ML 1993. *Tripanosomatídeos Parasitas de Vegetais: Ocorrência e Caracterização Fisiológica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 141 pp.
- Amorin MI, Momen H, Traub-Cseko YM 1993. *Trypanosoma rangeli*: sequence analysis of β -tubulin gene suggests closer relationship to *Trypanosoma brucei* than *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 53: 99-105.
- Andrade SG, Andrade V, Rocha Filho FD, Barral Netto M 1981. Análise antigênica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 23: 245-250.
- Anthony RL, Cody TS, Constantine NT 1981. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal hybridoma antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1192-1197.
- Aragão HB 1927. Sur un flagellé du latex de *Maniot palmata*, *Phytomonas francai* n. sp. *C R Soc Biol* 97: 1077-1080.
- Arnot DE, Barker DC 1981. Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. II. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Mol Biochem Parasitol* 3: 47-56.
- Ashall F, Miles MA 1988. Diagnosis of parasitic diseases using DNA-to-DNA hybridization. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 235-236.
- Attias M, De Souza W 1986. Axenic cultivation and ultrastructural study of a *Phytomonas* sp. isolated from the milkweed plant *Euphorbia hyssopifolia*. *J Protozool* 33: 84-87.
- Attias M, De Souza W 1992. Stereological study of isolates of the genus *Phytomonas*. *Acta Microsc* 1: 45-54.
- Attias M, Roitman I, Camargo EP, Dollet M, De Souza W 1988. Comparative analysis of the fine structure of four isolates of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Protozool* 35: 365-370.
- Attias M, Teixeira MM, Camargo EP, De Souza W 1993. Immunocytochemical localization of antigenic sites in some *Phytomonas* isolates using monoclonal antibodies to *Phytomonas serpens*. *Biocell* 17: 89-93.
- Avila H, Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 42: 175-188.
- Avise JC 1994. Systematic value of electrophoretic data. *Syst Zool* 23: 465-481.
- Ayala SC 1970. Two new trypanosomes from California toads and lizards. *J Protozool* 17: 370-373.
- Aymerich S, Goldenberg S 1987. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* DM28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp Parasitol* 69: 107-115.
- Ayroza-Galvão AL, Coutinho JO 1941. Nota sobre um flagelado parasita de anofelinos do sub-gênero "Nyssorhynchus", "Herpetomonas pessoai" n. sp. (Mastigophora, Trypanosomatidae). *Rev Bras Biol* 1: 311-319.
- Bagster IA, Parr CW 1973. Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. *Nature* 244: 364-366.
- Bailey CH, Brooks WM 1972. Histological observations on larvae of the eye gnat, *Hippelates pusio* (Diptera: Chloropidae), infected with the flagellate *Herpetomonas muscarum*. *J Invert Pathol* 19: 342-353.
- Baker JR 1961. The distribution of nucleic acids in

- Trypanosoma evansi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 55: 518-524.
- Baker JR 1963. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. *Exp Parasitol* 13: 219-233.
- Barker DC, Arnot DE 1981. Biochemical identification of cutaneous *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and bouyant density analysis. *Mol Biochem Parasitol* 3: 33-46.
- Barker DC, Butcher J 1983. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 285-297.
- Barker DC, Butcher J, Gibson LJ, Kennedy WPK, Williams RH, Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Lainson R, Shaw JJ 1986. Sequence homology of kinetoplast DNA in *Leishmania* studied by filter hybridisation of endonuclease digested fragments and "in situ" hybridisation of individual organisms, pp. 41-55. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Baron LI, Yurchenko VY, Kolesnikov AA 1995. Structure of minicircle DNA from a river perch trypanosome. *Mol Biol* 29 (n° 6, part 2): 801-805.
- Basso B, Moretti ERA, Vottero-Cima E 1986. *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi* and *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. I. Comparative studies by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Rev Lat-amer Microbiol* 28: 265-269.
- Bastien P, Blaineau C, Pagès M 1992. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell Biochem* 18: 131- 187.
- Batistoti M, Ogata SY, Kaneshima EN, Cavazzana Jr M, Catarino LMGM, Jankevicius JV, Ueno CT, Baccan GC, Gonçalves CCM, Marques AL, Itow-Jankevicius S. 1996. Enzymatic profiles of ornithine-arginine cycle of fifty isolates from phytophagous Hemiptera. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 102.
- Beard CB, Butler JF, Greiner EC 1989. *In vitro* growth characterization and host-parasite relationship of *Leptomonas pulexsimulantis* n. sp., a trypanosomatid flagellate of the flea *Pulex simulans*. *J Parasitol* 75: 658-668.
- Becker ER 1923a. Observations on the morphology and life history of *Herpetomonas muscae-domesticae* in North American muscoid flies. *J Parasitol* 9: 199-213.
- Becker RE 1923b. Transmission experiments on the specificity of *Herpetomonas muscae-domesticae* in muscoid flies. *J Parasitol* 10: 25-34.
- Béjà O, Goldring A, Karchi M, Michaeli S 1993. Development of a genetic system for the lower trypanosomatid *Leptomonas collosoma*. *J Euk Microbiol* 40: 21A.
- Béjà O, Schwartz D, Michaeli S 1994. Karyotype analysis of the monogenetic trypanosomatid *Leptomonas collosoma*. *Mol Biochem Parasitol* 66: 71-81.
- Bellosillo GC 1937. *Herpetomonas muscarum* (Leidy) in *Lucilia sericata* Meigen. *Philipp J Sci* 63: 285-305.
- Benne R 1990. RNA editing in trypanosomes: is there a message? *Trends Genet* 6: 177-181.
- Beverley SM, Ismach R, McMahon-Pratt D 1986. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns, pp. 265-267. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Beverley SM, Ismach RB, McMahon-Pratt D 1987. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84: 484-488.
- Bhattacharyya R, Singh R, Hazra TK, Majumder HK 1993. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *FEMS Microbiol Lett* 114: 99-104.
- Borst P, Fase-Flower F, Weijers PJ, Barry JD, Tetley L, Vickerman K 1985. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol Biochem Parasitol* 15: 129-142.
- Borst P, Fase-Fowler F, Frash ACC, Hoeijmakers JHJ, Weijers PJ 1980a. Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. *Mol Biochem Parasitol* 1: 221-246.
- Borst P, Fase-Fowler F, Gibson WC 1981. Quantitation of genetic differences between *Trypanosoma brucei gambiense*, *rhodesiense* and *brucei* by restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. *Mol Biochem Parasitol* 3: 117-131.
- Borst P, Fase-Fowler F, Gibson WC 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol* 23: 31-38.
- Borst P, Fase-Fowler F, Hoeijmakers JHJ, Frash ACC 1980b. Variations in maxi-circle and mini-circle sequences in kinetoplast DNAs from different *Trypanosoma brucei* strains. *Biochim Biophys Acta* 610: 197-210.
- Borst P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J 1982. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 6: 13-23.
- Böse R, Heister NC 1993. Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in tabanids. *J Euk Microbiol* 40: 788-792.
- Böse R, Petersen K, Pospichal H, Buchanan N, Tait A 1993. Characterization of *Megatrypanum* trypanosomes from European Cervidae. *Parasitology* 107: 55-61.
- Bosompem KM, Assoku RKG, Nantulya VM 1996. Differentiation between culture-derived insect stages of *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* and *T.*

- simiae* using a monoclonal antibody-based dot-ELISA. *Parasitology* 112: 59-66.
- Brack C 1968. Elektronenmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 25: 289-356.
- Brandão AA, Miranda A, Degrave WM, Sousa MA 2000. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Res* 86: 809-812. (Anexo 7.1.7)
- Branquinha MH, Bergter EB, Meirelles MNL, Vermelho AB 1994a. Glycolipid and protein profiles in trypanosomatids. *Parasitol Res* 80: 336-341.
- Branquinha MH, Meirelles MNL, Lopes A, Moreira C, Vermelho AB 1995. Use of glycoconjugates for trypanosomatid taxonomy. *Curr Microbiol* 30: 77-82.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, Bonaldo MC 1994b. Characterization of proteinases in trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res* 27: 495-499.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, Bonaldo MC 1996. Ubiquity of cystein- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Euk Microbiol* 43: 131-135.
- Brazil RP, Faria-e-Silva PM, Cupolillo E, Momen H, Fiorini JE 1991. Isoenzymatic characterization of a isolate of *Phytomonas* sp. from *Leptoglossus stigma* (Hemiptera: Coreidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 (Suppl. 1): 271.
- Breniere SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 46: 335-341.
- Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, Noireau F 1995. Field application of ploymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomones. *Am J Trop Med Hyg* 53: 179-184.
- Bretting H, Schottelius J 1978. Immunfluoreszenzmikroskopische unterscheidung zwischen *T. cruzi*, *T. cruzi*-like stämmen, *T. conorhini* und *T. rangeli* mit dem protektin des schwammes *Aaptos papillata*. *Z Parasitenkd* 57: 213-219.
- Briones MRS, Nelson K, Beverley SM, Affonso HT, Camargo EP, Floeter-Winter LM 1992. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol* 53: 121-128.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 171-172.
- Brun R 1974. Ultrastruktur und zyklus von *Herpetomonas muscarum*, "*Herpetomonas mirabilis*" und *Crithidia luciliae* in *Chrysomyia chloropyga*. *Acta Trop* 31: 219-290.
- Bulat SA, Kaboev OK, Mironenko NV, Ibatullin PM, Luchkina LA, Suslov AV 1992. Polymerase chain reaction with universal primers for study of genomes. *Soviet Genet* 28: 549-557.
- Bulat SA, Mokrousov IV, Podlipaev SA 1999. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. *Europ J Protistol* 35: 319-326.
- Burstein Z, Romero OR 1956. Flagelados en el latex de la *Jathropha macrantha*. *Arch Per Pat Clin* 10: 1-12.
- Buth DG 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Annu Rev Ecol Syst* 15: 501-522.
- Camargo AC, Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Campelo ASG, Ziccardi M, Cavazzana Jr M, Kaneshima EN, Itow-Jankevicius S 1996. On the polymorphism of *Herpetomonas dedonderi* Dedet et al. 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 93. (Anexo 7.3.4)
- Camargo EP 1979. *Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico*. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 158 pp.
- Camargo EP 1979. Towards a biochemical taxonomy of trypanosomatids, p. M14-16. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*, Rio de Janeiro.
- Camargo EP 1995. Molecular characters and the taxonomy of trypanosomatids. In: *Phytomonas in their Newly Discovered Role as Plant Pathogens*, BEMET Course, Granada.
- Camargo EP 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29-112.
- Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN 1978a. *Trypanosoma* ssp., *Leishmania* ssp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol* 46: 141-144.
- Camargo EP, Itow S, Alfieri SC 1978b. Proteolytic activities in cell extracts of trypanosomatids. *J Parasitol* 64: 1120-1121.
- Camargo EP, Mattei DM, Barbieri CL, Morel CM 1982. Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes, and of 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 L 1992. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower 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, Wallace FG 1994. Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida). *Adv Dis Vector Res* 10: 333-359.
- Campaner M, Kastelein P, Sanchez-Moreno M, Teixeira MMG, Camargo EP 1996. Different *Phytomonas* spp. circulate among Solanaceae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 101.
- Campaner M, Takata CSA, Serrano MG, Sanchez-Moreno M, Teixeira MMG, Camargo EP 1995. Two new trypanosomatids isolated from plants which are not of the genus *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (Suppl I): 277.
- Cano MI, Gruber A, Vasquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, Degraive W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Silveira JF 1995. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mol Biochem Parasitol* 71: 273-278.
- Carle GF, Olson MV 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 12: 5647-5664.
- Carvalho ALM 1973. Estudos sobre a posição sistêmica, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Pat Trop* 2: 223-274.
- Carvalho ALM, Deane MP 1974. Trypanosomatidae isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs. *J. Protozool* 21: 5-8.
- Cavazzana Jr M, Batistoti M, Romão C, Takimoto CA, Baccan GC, Jankevicius JV, Ogatta SFY, Yang AV, Itow-Jankevicius S 1998. Experimental infection of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and maize (*Zea mays*) with trypanosomatids isolated from insects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 115.
- Cazzulo JJ, Cazzulo BMF, Engel JC, Cannata JB 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 16: 329-343.
- Cerisola JA, Del Prado CE, Rohwedder R, Bozzini JP 1971. *Blastocrithidia triatoma* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *J Protozool* 18: 503-506.
- Ceron CR, Caldas RA, Felix CR, Mundim MH, Roitman I 1979. Purine metabolism in trypanosomatids. *J Protozool* 26: 479-483.
- Chance ML 1972. DNA base composition differences between species of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 352.
- Chance ML, Peters W, Griffiths HW 1973. A comparative study of DNA in the genus *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67: 24-25.
- Chance ML, Peters W, Shchory L 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I: Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol* 68: 307-316.
- Chang KP 1974. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. *J Protozool* 21: 699-707.
- Chatton E, Alilaire E 1908. Coexistence d'un *Leptomonas* (*Herpetomonas*) et d'un *Trypanosoma* chez un muscivore non vulnérant, *Drosophila confusa* St.Eger. *C R Soc Biol* 64: 1004-1006.
- Chatton E, Leger A 1911. Eutrypanosomes, leptomonas et leptotrypanosomes chez *Drosophila confusa* Starger (Muscidae). *C R Soc Biol* 70: 34-36.
- Chiari E, Camargo EP 1984. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*, pp. 23-26. In: CM Morel (ed), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Chu G, Vollrath D, Davis RW 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.
- Clark CG 1992. Riboprinting: a molecular approach to the identification and taxonomy of Protozoa, p. D4.1-D4.4. In: JJ Lee, AT Soldo (eds), *Protocols in Protozoology*, Allen Press, Lawrence.
- Clark CG 1997. Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *J Euk Microbiol* 44: 277-283.
- Clark CG, Martin DS, Diamond LS 1995. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *J Euk Microbiol* 42: 92-96.
- Clark CG, Pung OJ 1994. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol* 66: 175-179.
- Conchon I, Campaner M, Sbravate C, Camargo EP 1989. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J Protozool* 36: 412-414.
- Costacurta RA, Oliveira FL, Rocha KM, Yang AV, Tano MS, Reiche EMV, Gonçalves CCM, Okamura H, Itow-Jankevicius S, Jankevicius JV 1997. Cross-reactivity between *Leishmania* and trypanosomatids isolated from plants and a phytophagous insect (TIPPI) by Western Blotting (WB). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 131.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr E, Momen H, Beverley SM 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 73: 145-155.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H 1994. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
- D'Alessandro-Bacigalupo A, Saravia NG 1992. *Trypanosoma rangeli*, pp. 1-54. In: JP Kreier, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., vol 2, Academic Press, San Diego.
- Daggett PM, Dollahon N, Janovy Jr J 1972. *Herpetomonas megaseliae* sp. n. (Protozoa: Trypanosomatidae) from *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) Schmitz, 1929 (Diptera:

- Phoridae). *J Parasitol* 58: 946-949.
- De Souza W 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I): 17-36.
- De Souza W, Attias M 1991. Cell biology of *Phytomonas*, trypanosomatids parasites of plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 275-284.
- Deane MP, Sousa MA, Pereira NM, Gonçalves AM, Momen H, Morel CM 1984. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J Protozool* 31: 276-280.
- Dedet JP, Geoffroy B, Benichou JC 1986. *Herpetomonas dedonderi* n. sp. (Sarcocystidophora, Trypanosomatidae) from *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 (Diptera, Culicidae). *J Protozool* 33: 530-533.
- Dedet JP, Pratlong F 2000. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J Euk Microbiol* 47: 37-39.
- Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Huerre M 1995. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 644-646.
- Degrave W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Pereira JB, Bozza M, Lopes U, Morel C 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 367-368.
- Dias E, Freitas L 1943. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. I. Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 38: 427-436.
- Dias-Neto E, Siqueira AM, Romanha AJ, Pinto AS 1991. DNA of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cruzi*-like: determination of the Tm and percentage (G+C) content by hydroxylapatite thermal elution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 (Suppl): 156.
- Dietrich P, Dussan MP, Floeter-Winter LM, Affonso MHT, Camargo EP, Soares MB 1990. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *Mol Biochem Parasitol* 42: 13-20.
- Dirie MF, Murphy NB, Gardiner PR 1993a. DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intra-specific relationships. *J Euk Microbiol* 40: 132-134.
- Dirie MF, Otte MJ, Thatthi R, Gardiner PR 1993b. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitology* 106: 21-29.
- Dollahon NR, Janovy Jr J 1971. Insect flagellates from feces and gut contents of four genera of lizards. *J Parasitol* 57: 1130-1132.
- Dollet M 1984. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*). *Annu Rev Phytopathol* 22: 115-132.
- Dollet M 1994. Identification and characterization of pest organisms: a plant trypanosomes case study, pp. 415-426. In: DL Hawksworth (ed), *The Identification and Characterization of Pest Organisms*, CAB International, Wallingford.
- Dollet M, Cambony D, Gargani D 1982. Culture axénique *in vitro* de *Phytomonas* sp. (Trypanosomatidae) d'Euphorbe, transmis par *Stenocephalus agilis* Scop (Coreide). *C R Acad Sc Paris* 295 (Série III): 547-550.
- Dollet M, Giannotti J, Ollagnier M 1977. Phytopathologie. Observation de protozoaires flagellés dans les tubes cribles de Palmiers à huile malades. *C R Acad Sc Paris* 284 (Série D): 643-645.
- Dollet M, Marche S, Gargani D, Muller E, Baltz T 1996. Virus of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.), pp. 227-236. In: M Nicole, V Giazinazzi-Pearson (eds), *Histology, Ultrastructural and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Dollet M, Wallace FG 1987. Compte rendu du premier *Phytomonas* Workshop. *Oléagineux* 42: 461-465.
- Donovan C 1909. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). *Lancet* 4499: 1495-1496.
- Dooris PM, McGhee RB 1976. Immunologic and electrophoretic characteristics of two species of *Crithidia*. *J Protozool* 23: 433-437.
- Drbohlav JJ 1926. The cultivation of *Herpetomonas muscarum* (Leidy 1856) Kent 1881 from *Lucilia sericata*. *J Parasitol* 12: 183-190.
- Du Buy HG, Mattern CFT, Riley FL 1963. Isolation and characterization of DNA from kinetoplasts of *Leishmania enriettii*. *Science* 147: 754-756.
- Du Y, Chang KP 1994. Phylogenetic heterogeneity of three *Crithidia* spp. vs. *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 66: 171-174.
- Dutra PML, Santos MAA, Couto LC, Rodrigues CO, Barros FS, Lopes AHCS, Romeiro A, Attias M, Meyer-Fernandes JR 1997. Comparative study of secreted phosphatase activity between trypanosomatids parasites of plants and of house flies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 131.
- Dvorak JA, Hall TE, Crane MStJ, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R 1982. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 29: 430-437.
- Ebert F 1973. Charakterisierung von *Leishmania donovani*-stämmen mit der disk-elektrophorese. *Z Tropenmed Parasit* 24: 517-524.
- Ebert F 1986. Isoenzymes of *Trypanosoma rangeli* stocks and their relation to other trypanosomes transmitted by triatomine bugs. *Tropenmed Parasit* 37: 251-254.

- Ebert F, Schudnagis R, Mühlpfordt H 1978. Protein typing by disc electrophoresis of some species of trypanosomes with special emphasis to *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasit* 29: 115-118.
- Elkeles G 1944. Investigaciones sobre la evolution del *Trypanosoma cruzi*, especialmente sobre la genesis de la forma tripanosomica. *Bol Acad Nac Cien (Cordoba)* 36: 330-408.
- Engleberg NC, Eisenstein BI 1984. The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *N Engl J Med* 311: 892-901.
- Englund PT, Hajduk SL, Marini JC 1982. The molecular biology of trypanosomes. *Annu Rev Biochem* 51: 695-726.
- Englund PT, Marini JC 1980. The replication of kinetoplast DNA. *Am J Trop Med Hyg* 29: 1064-1069.
- Etges R 1992. Identification of a surface metallo-proteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Trop* 50: 205-217.
- Fantham HB 1925. Some parasitic Protozoa found in South Africa (VIII). *South African J Sci* 22: 346-354.
- Faria-e-Silva PM, Fiorini JE, Soares MJ, Alviano CS, De Souza W, Angluster J 1994. Membrane-associated polysaccharides composition, nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. *J Euk Microbiol* 41: 55-59.
- Faria-e-Silva PM, Soares MJ, De Souza W 1996. Proliferative opisthomastigote forms in *Herpetomonas roitmani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Res* 82: 125-129.
- Faria-e-Silva PM, Solé-Cava AM, Soares MJ, Motta MCM, 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.
- Fernandes O, Degraeve W, Campbell DA 1993. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudini*. *Parasitology* 107: 219-224.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 66: 261-271.
- Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, Campbell DA 1997. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Euk Microbiol* 44: 535-539.
- Fernández-Becerra C, Sánchez-Moreno M, Osuna A, Opperdoes FR 1997. Comparative aspects of energy metabolism in plant trypanosomatids. *J Euk Microbiol* 44: 523-529.
- Figueiredo EN, Yoshida N, Roitman C, Camargo EP 1978. Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Crithidia*. *J Protozool* 25: 546-549.
- Figuerola F, Mayer WE, Lom J, Dyková I, Weller M, Pecková H, Klein J 1999. Fish trypanosomes: their position in kinetoplastid phylogeny and variability as determined from 12S rRNA kinetoplast sequences. *J Euk Microbiol* 46: 473-481.
- Fiorini JE, Cucolichio G, Rezende D, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, De Souza W 1996. Biochemical and morphobiological study of a trypanosomatidae isolated from mulberry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 99.
- Fiorini JE, Faria-e-Silva PM, Brazil RP, Roitman I, Angluster J, De Souza W, Esteves MJG 1986. Detection of trypanosomatids in the *Solanum gilo* and *Solanum lycopersicum* in Alfenas, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl): 33.
- Fiorini JE, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, Brazil RP 1989. Três novas espécies de tripanosomatídeos de insetos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 69-74.
- Fiorini JE, Takata CS, Teofilo VM, Nascimento LC, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, Teixeira MMG, De Souza W 2000. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpessoar camargoi* n. subsp., a trypanosomatid isolated from the flower of the squash *Cucurbita moschata*. *J Euk Microbiol* (no prelo).
- Fish WH, Holz Jr GG, Beach DH, Owen E, Anekwe GE 1981. The cyclopropane fatty acid of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 3: 103-115.
- Flu PC 1911. Studien über die im darm der stubenfliege, *Musca domestica*, vorkommenden protozoären gebilde. *Z Bakteriol* 57: 522-535.
- França C 1914. La flagellose des Euphorbes (I). *Arch Protistenkd* 34: 108-132.
- França C 1919. L'insecte transmetteur de *Leptomonas Davidi*. *Bull Soc Pathol Exot* 12: 513-514.
- França C 1920. La flagellose des Euphorbes (II). *Ann Inst Pasteur* 34: 432-465.
- França C 1921. Sur deux phytoflagellés (*L. Elmassiani* Migone et *L. Bordasi* sp. n.). *Ann Soc Belge Med Trop* 1: 245-254.
- Franchini G 1922. Nouvelles recherches sur les trypanosomes des euphorbes et sur leur culture. *Bull Soc Pathol Ext* 15: 299-303.
- Franchini G 1931. Étude sur un flagellé spécial du latex d'un figuier de l'Erythrée (*Ficus hochstetteri* (Mg) A. Rich). *Bull Soc Path Exot* 24: 843-848.
- Franco AMR, Grimaldi Jr G 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the Neotropical tree sloths (Edentata). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 261-268.
- Franco AMR, Machado GMC, Naiff RD, Moreira CFS, McMahon-Pratt D, Grimaldi Jr G 1997. Characterization of *Endotrypanum* parasites using specific monoclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 63-68.

- Franco AMR, Momen H, Naiff RD, Moreira CFS, Deane MP, Grimaldi Jr G 1996. Enzyme polymorphism in *Endotrypanum* and numerical analysis of isoenzyme data. *Parasitology* 113: 39-48.
- Frasch ACC, Goijman SG, Cazzulo JJ, Stoppani AOM 1981. Constant and variable regions in DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: application to species and stock differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 4: 163-170.
- Freedman LJ, Hanson ED 1970. Further observations on the life cycle of *Leptomonas karyophilus*. *J Protozool* 17 (Suppl): 18A.
- Freytmüller E, Camargo EP 1981. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *J Protozool* 28: 175-182.
- Frolov AO, Malysheva MN 1989. *Crithidia allae* sp. n. and *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa: Trypanosomatidae) from the bug *Nabis brevis* (Hemiptera: Nabidae). *Zoologich Z* 68: 5-10 (em russo, sumário em inglês).
- Galinari S, Camargo EP 1978. Trypanosomatid Protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. *Exp Parasitol* 46: 277-282.
- Galinari S, Camargo EP 1979. Urea cycle enzymes in wild and aposymbiotic strains of *Blastocrithidia culicis*. *J Parasitol* 65: 88.
- Galvão AB, Oliveira RL, Carvalho ALM, Veiga GP 1970. *Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). *Rev Goiana Med* 16: 229-236.
- Gardener PJ 1977. Taxonomy of the genus *Leishmania*: a review of nomenclature and classification. *Trop Dis Bull* 74: 1069-1088.
- Gardener PJ, Howells RE 1972. Isoenzyme variation in leishmanial parasites. *J Protozool* 19 (Suppl): 47.
- Garnham PCC 1971. The genus *Leishmania*. *Bull WHO* 44: 477-489.
- Garside L, Bailey M, Gibson W 1994. DNA content and molecular karyotype of trypanosomes of the subgenus *Nannomonas*. *Acta Trop* 57: 21-28.
- Gazzinelli RT, Romanha AJ, Fontes G, Chiari E, Gazzinelli G, Brener Z 1991. Distribution of carbohydrates recognized by the lectins *Euonymus europaeus* and Concanavalin A in monoxenic and heteroxenic trypanosomatids. *J Protozool* 38: 320-325.
- Gero AM 1998. Purine stress in *Crithidia*: adaptation of a parasite to environmental stress. *Parasitol Today* 14: 277-281.
- Ghosh DK, Ghosh AK, Bhattacharya A 1987. Differentiation of *Leishmania* strains of Indian origin by lectin-mediated agglutination. *Tropenmed Parasit* 38: 331-332.
- Ghosh DK, Ghosh AK, Ghosh KN, De A, Bhattacharya A 1990. Kinetoplastid flagellates: surface-reactive carbohydrates detected by fluorescein-conjugated lectins. *J Parasitol* 76: 130-133.
- Giannini SH, Schittini M, Keithly JS, Warburton PW, Cantor CR, Van der Ploeg LHT 1986. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science* 232: 762-765.
- Gibbs AJ 1947. Observations on *Leptomonas ctenocephali* (Fantham, 1912). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 40: 495-500.
- 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. *Parasitology* 47: 297-303.
- Gibson W 1994. Identification of trypanosomes in animals, humans and *Glossina*. *Bull Soc Path Exot* 87: 315-318.
- Gibson W, Mehlitz D, Lanham SM, Godfrey DG 1978. The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. *Tropenmed Parasit* 29: 335-345.
- Gibson WC, Marshall TFC, Godfrey DG 1980. A numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of the subgenus *Trypanozoon*. *Adv Parasitol* 18: 175-246.
- Gilles C, Hanson ED 1963. A new species of *Leptomonas* parasitizing the macronucleus of *Paramecium thrichium*. *J Protozool* 10: 467-473.
- Godfrey DG, Kilgour V 1976. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of *Gambia* trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 219-224.
- Gomez-Eichelmann MC, Holz Jr G, Beach D, Simpson AM, Simpson L 1988. Comparison of several lizard *Leishmania* species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Mol Biochem Parasitol* 27: 143-158.
- Gonçalves AM, Nehme NS, Saravia N, Segura I, Morel CM 1991. Schizodeme analysis with the restriction endonuclease *RSAI* differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 477-478.
- Gonçalves-de-Lima VMQ, Roitman I, Alves CS 1982. Comparison of six isoenzymes from 10 species of *Crithidia*. *J Protozool* 29: 397-401.
- Gonçalves-de-Lima VMQ, Roitman I, Kilgour V 1979. Five trypanosomatid species of insects distinguished by isoenzymes. *J Protozool* 26: 648-652.
- González N, Galindo I, Guevara P, Novak E, Scorza JV, Añez N, Silveira JF, Ramírez JL 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J Clin Microbiol* 32: 153-158.
- Görtz HD 1986. Endonucleobiosis in Ciliates. *Int Rev Cytol* 102: 169-213.

- Görtz HD, Dieckmann J 1987. *Leptomonas ciliatorum* n. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the macronucleus of a hypotrichous ciliate. *J Protozool* 34: 259-263.
- Grassé PP 1952. *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*, vol 1, pp. 602-668, Masson et Cie, Paris.
- Gray AR 1970. A study of the antigenic relationships of isolates of *Trypanosoma brucei* collected from a herd of cattle kept in one locality for five years. *J Gen Microbiol* 62: 301-313.
- Greig SR, Akinsehina FA, Ashall F, Lainson R, Shaw JJ, Miles MA, Barker DC 1989. The feasibility of discrimination between *Leishmania* and *Endotrypanum* using total parasite DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 196.
- Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D 1996. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 37-42.
- Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44: 645-661.
- Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, Romanha AJ 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 203-209.
- Guerrini F, Segur C, Gargani D, Tibayrenc M, Dollet M 1992. An isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*: genetic, taxonomic and epidemiologic significance. *J Protozool* 39: 516-521.
- Gueugnot J, Petavy AF, Guillot J, Damez M, Coulet M 1980. Etude comparative de la fixation de lectines sur les membranes de quatre espèces de *Crithidia*. *Protistologica* 16: 33-38.
- Guevara P, Alonso G, Silveira JF, Mello M, Scorza JV, Añez N, Ramírez JL 1992. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol* 56: 15-26.
- Gutteridge WE 1976. Biochemistry of *Trypanosoma cruzi*. *PAHO Scient Publ* 318: 135-140.
- Haag J, O'hUigin C, Overath P 1998. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol* 91: 37-49.
- Hanson WL, McGhee RB 1961. The biology and morphology of *Crithidia acanthocephali* n. sp., *Leptomonas leptoglossi* n. sp. and *Blastocrithidia euschisti* n. sp. *J Protozool* 8: 200-204.
- Hanson WL, McGhee RB 1963. Experimental infection of the hemipteron *Oncopeltus fasciatus* with Trypanosomatidae isolated from other hosts. *J Protozool* 10: 233-238.
- Hanson WL, McGhee RB, Blake JD 1966. Experimental infection of various latex plants of the family Asclepiadaceae with *Phytomonas elmassiani*. *J Protozool* 13: 324-327.
- Harvey RB, Lee SB 1943. Flagellates of laticiferous plants. *Plant Physiol* 18: 633-655.
- Hassan MQ, Ghosh A, Ghosh SS, Gupta M, Basu D, Mallik KK, Adhya S 1993. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacer of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology* 107: 509-517.
- Hauschka TS, Goodwin MB, Palmquist J, Brown E 1950. Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med* 30: 1-16.
- Henriksson J, Åslund L, Pettersson U 1996a. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12: 108-114.
- Henriksson J, Solari A, Rydaker M, Sousa OE, Pettersson U 1996b. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 112: 385-391.
- Hillis DM, Moritz G (eds) 1990. *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, 588 pp.
- Hoare CA 1924. A note on the specific name of the herpetomonad of the house-fly. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 17: 403-406.
- Hoare CA 1931. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life-cycle in the tsetse-fly and in the crocodile. *Parasitology* 23: 449-484.
- Hoare CA 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool* 11: 200-207.
- Hoare CA 1967. Evolutionary trends in mammalian trypanosomes. *Adv Parasitol* 5: 47-91.
- Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 722 pp.
- Hoare CA, Wallace FG 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212: 1385-1386.
- Hoch A, Ryan L, Vexenat JA, Rosa ACOC, Barreto AC 1986. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl): 62.
- Hollar L, Lukes J, Maslov DA 1998. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *J Euk Microbiol* 45: 293-297.
- Hollar L, Maslov DA 1997. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol* 89: 295-299.
- Holmes FO 1925. Non-pathogenicity of the milkweed flagellate in Maryland. *Phytopathology* 15: 294-296.
- Hudson L, Guhl F, Marinkelle CJ, Rodriguez J 1987. Use of monoclonal antibodies for the differential detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in epidemiological studies and xenodiagnosis. *Acta Trop* 44: 387-394.

- Hutner SH, Bacchi CJ, Baker H 1979. Nutrition of the Kinetoplastida, pp. 653-691. In: WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 2, Academic Press, London.
- Itikawa O, Ogura Y 1964. The Feulgen reaction after hydrolysis at room temperature. *Stain Technol* 29: 13-15.
- Itow-Jankevicius S, Almeida ML, Jankevicius JV, Cavazzana Jr M, Attias M, De Souza W 1993. Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* Coreidae) and their experimental transmission. *J Euk Microbiol* 40: 576-581.
- Jadin JM, Creemer J 1968. Étude de la pinocytose dans les formes en rosaces de *Leptomonas ctenocephali*. *Acta Trop* 25: 363-366.
- Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, Carmo JB, Dutra-Menezes MCN, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csekö YM, Borges MB, Moreira N 1988. Ciclo biológico de *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (Suppl 1): 601-610.
- 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.
- Janovy Jr J, Lee KW, Brumbaugh JA 1974. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations. *J Protozool* 21: 53-59.
- 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.
- Jirku M, Kolesnikov AA, Benada O, Lukes J 1995. Marine fish and ray trypanosomes have large kinetoplast minicircle DNA. *Mol Biochem Parasitol* 73: 279-283.
- Johnson P, Neal RA, Gall D 1963. Protective effect of killed trypanosoma vaccines with incorporated adjuvants. *Nature* 200: 83.
- Johnson PD 1933. A case of infection by *Trypanosoma lewisi* in a child. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 26: 467-468.
- Kastelein P, Karyosemito C, Segeren P 1984. The role of weeds in the incidence of "hartrot" or "fatal wilt" of palms. III. Enumeration of weeds as host of the protozoa *Phytomonas* (Trypanosomatidae) and attempts of culturing the flagellates. *De Surin Landb* 32: 25-42.
- Ketteridge D 1975. Differentiation of newly isolated strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* by agglutination and precipitation reactions. *Acta Trop* 32: 173-189.
- Kilgour V, Godfrey DG 1973. Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. *Nature* 244: 69.
- Killick-Kendrick R, Lainson R, Rioux JA, Safjanova VM 1986. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles, pp. 143-148. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie e Phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Kleisen CM, Borst P, Weijers PJ 1975. The structure of kinetoplast DNA. I. Properties of the intact multicircular complex from *Crithidia luciliae*. *Biochim Biophys Acta* 390: 155-167.
- 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.
- Kooy RF, Ashall F, Van der Ploeg M, Overdulve JP 1989. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 36: 73-76.
- Kreutzer RD, Souraty N, Semko ME 1987. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 22-32.
- Kudo RR 1966. *Protozoologia*, 1ª ed, Compañia Editorial Continental, México, 905 pp.
- Lafont A 1909. Sur la présence d'un parasite de la classe des Flagellés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. *C R Soc Biol* 66: 1011-1013.
- Lafont A 1910. Sur la présence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des flagellés, dans le latex de trois euphorbiacées. *Ann Inst Pasteur* 24: 205-219.
- Lainson R, Shaw JJ 1966. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. III. On the cross-immunity between Panamanian cutaneous leishmaniasis and *Leishmania mexicana* infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 533-535.
- Lainson R, Shaw JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis, pp. 1-116. In: WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 2, Academic Press, London.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution, pp. 1-120. In: W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol 1, Academic Press, London.
- Lainson R, Shaw JJ 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciênc Cult* 44: 94-106.
- Laird M 1959. *Blastocrithidia* n. g (Mastigophora: Protomonadina) for *Crithidia* (in part), with a subarctic record for *B. gerridis* (Patton). *Can J Zool* 37: 749-752.
- Langridge DF, McGhee RB 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *J Protozool* 14: 485-487.
- Lanham SM, Grendon JM, Miles MA, Povoia MM, Souza AAA 1981. A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I: Standard stocks of

- Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 742-750.
- Lanotte G, Rioux JA, Maazoun R, Pasteur N, Pralong F, Lepart J 1981. Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol (Paris)* 56: 575-592.
- Lanotte G, Rioux JA, Serres E 1986. Approche cladistique du genre *Leishmania* Ross, 1903, pp. 269-288. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Latif BMA, Adam KMG 1973. Differentiation of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense* by indirect fluorescent antibody test. *Bull WHO* 48: 401-407.
- Le Blancq SM, Cibulskis RE, Peters W 1986. *Leishmania* in the Old World: 5. Numerical analysis of isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 517-524.
- Le Ray D, Vickerman K 1977. Are there any free-living trypanosomatids? *J Protozool* 24: 8A.
- Léger ML 1902a. Sur la forme grégarinienne des *Herpetomonas*. *C R Soc Biol* 54: 400-401.
- Léger ML 1902b. Sur la structure et le mode de multiplication des flagellés du genre *Herpetomonas* Kent. *C R Soc Biol* 54: 398-400.
- Léger ML 1902c. Sur un flagellé parasite de l'*Anopheles maculipennis*. *C R Soc Biol* 54: 354-356.
- Léger L 1903. Sur quelques Cercomonadines nouvelles ou peu connues parasites de l'intestin des insectes. *Arch Protistenkd* 2: 180-189.
- Leon W, Frasch ACC, Hoeijmakers JHJ, Fase-Fowler F, Borst P, Brunel F, Davison J 1980. Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 607: 221-231.
- Levine ND 1978. Nomenclature of *Herpetomonas pessoai*. *J Parasitol* 64: 668.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool* 27: 37-58.
- Lewontin RC 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*, Columbia University Press, New York, 346 pp.
- Leidy J 1856. A synopsis of Entozoa and some of their ectocongeners observed by the author. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia* 8: 42-58 (apud Wallace 1966)
- Lima PFN, Motta MCM, Saraiva EMB 1997. Interaction of *Crithidia* and *Herpetomonas* species with *Anopheles gambiae*, *Aedes albopictus* and *Lutzomyia longipalpis* cell lines. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl 1): 71.
- López T, Melton Jr CG 1975. Cell volume and DNA content of *Trypanosoma lewisi* and *T. mega*. *J Parasitol* 61: 209-212.
- Lukes J, Jirku M, Doležel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov DA 1997. Analysis of ribosomal genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol* 44: 521-527.
- Lun ZR, Allingham R, Brun R, Lanham SM 1992a. The isoenzyme characteristics of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* isolated from domestic stocks in China. *Ann Trop Med Parasitol* 86: 333-340.
- Lun ZR, Brun R, Gibson W 1992b. Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* from China. *Mol Biochem Parasitol* 50: 189-196.
- Lun ZR, Desser SS 1996. Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Res* 82: 22-27.
- Lwoff M, Lwoff A 1931. Recherches sur la morphologie de *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden et *Leptomonas fasciculata* Novy, Mac Neal et Torrey. *Arq Zool Exp Gén* 71: 21-37.
- Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SDJ 1992a. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 55: 147-154.
- Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ 1992b. DNA fingerprintings: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 53: 63-70.
- Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SDJ 1993. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*, pp. 321-329. In: SDJ Pena, R Chakraborty, JT Epplen, AJ Jeffreys (eds), *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Macina RA, Sanchez DO, Gluschkof DA, Burrone OR, Frasch ACC 1986. Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 21: 25-32.
- Malvezzi A, Takata CSA, Campaner M, Teixeira MMG, Camargo EP 1996. High genetic heterogeneity of symbiont-harboring trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 91.
- Manaiá AC, Cordeiro NS, Seixas ASS, Tonon S, Miranda AMM 1991. Effect of physicochemical conditions on growth of an insect trypanosomatid. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 (Suppl I): 268.
- Manaiá AC, Souza MCM, Lustosa ES, Roitman I 1981. *Leptomonas lactosovorans* n. sp., a lactose-utilizing trypanosomatid: description and nutritional requirements. *J Protozool* 28: 124-126.
- Manwell RD 1968. *Introduction to Protozoology*, Dover Publications Inc, New York, 642 pp.
- Marakhova NV, Skarlato SO, Frolov AO, Tsouladze AM 1991. The molecular karyotype polymorphism in the lower trypanosomatids. *Tsitologiya* 33 (10): 59-66 (em russo, sumário em inglês).

- Marché S, Roth C, Philippe H, Dollet M, Baltz T 1995. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol* 71: 15-26.
- Martin DS, Desser SS, Hong H 1992. Allozyme comparison of three trypanosome species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *J Parasitol* 78: 317-322.
- Maslov DA, Lukes J 1998. Searching for a tree that can be trusted. *Parasitol Today* 14: 334.
- Maslov DA, Lukes J, 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, Simpson L 1995. Evolution of parasitism in kinetoplastid Protozoa. *Parasitol Today* 11: 30-32.
- Massamba NN, Williams RO 1984. Distinction of African trypanosome species using nucleic acid hybridization. *Parasitology* 88: 55-65.
- Mathieu-Daudé F, Tibayrenc M 1994. Isozyme variability of *Trypanosoma brucei* s.l.: genetic, taxonomic, and epidemiological significance. *Exp Parasitol* 78: 1-19.
- Mattei M, Goldenberg S, Morel C, Azevedo HP, Roitman I 1977. Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast-DNA. *FEBS Lett* 74: 264-268.
- Maxam AM, Gilbert W 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 74: 560-564.
- Mayer M, Rocha-Lima H 1914. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warmblüter und arthropoden. *Arch Schif Tropenhyg* 18: 101-136.
- Mayr E, Ashlock PD 1991. *Principles of Systematic Zoology*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 475 pp.
- McConnell E 1963. Leptomonads of wild-caught Panamanian *Phlebotomus*: culture and animal inoculation. *Exp Parasitol* 14: 123-128.
- McConnell E, Correa M 1964. Trypanosomes and other microorganisms from Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *J Parasitol* 50: 523-528.
- McGhee RB, Cosgrove WB 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 44: 140-173.
- McGhee RB, Hanson WL 1963. The relationship of various crithidias as determined by serological reactions. *J Protozool* 10: 239-243.
- McGhee RB, Hanson WL 1964. Comparison of the life cycle of *Leptomonas oncopelti* and *Phytomonas elmassiani*. *J Protozool* 11: 555-562.
- McGhee RB, Hanson WL 1971. Changes in structure of *Phytomonas elmassiani* in experimental infections of Apocynaceae, a presumably foreign plant host. *J Protozool* 18: 80-81.
- McGhee RB, Hanson WL, Schmittner SM 1969. Isolation, cloning and determination of biologic characteristics of five new species of *Crithidia*. *J Protozool* 16: 514-520.
- McGhee RB, McGhee AH 1979. Biology and structure of *Phytomonas staheli* sp. n., a trypanosomatid located in sieve tubes of coconut and oil palms. *J Protozool* 26: 348-351.
- McGhee RB, Postell FJ 1976. Axenic cultivation of *Phytomonas davidi* Lafont (Trypanosomatidae), a symbiote of laticiferous plants (Euphorbiaceae). *J Protozool* 23: 238-241.
- McLaughlin GL, Wood DL, Cain GD 1983. Lipids and carbohydrates in symbiotic and aposymbiotic *Crithidia oncopelti* and *Blastocrithidia culicis*. *Comp Biochem Physiol* 76B: 143-152.
- McMahon-Pratt D, Jaffe CL, Bennet E, David JR, Grimaldi Jr G 1986. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903, pp. 173-178. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- McMahon-Pratt D, Jaffe CL, Grimaldi G 1984. Application of monoclonal antibodies to classification of *Leishmania* species, pp. 121-135. In: CM Morel (ed), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Mebrahtu YB, Lawyer PG, Pamba H, Koech D, Perkins PV, Roberts CR, Were JB, Hendricks LD 1992. Biochemical characterization and zymodeme classification of *Leishmania* isolates from patients, vectors, and reservoirs hosts in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 47: 852-892.
- Medina-Acosta E, Franco AMR, Jansen AM, Sampaio M, Nevés N, Pontes-de-Carvalho L, Grimaldi Jr G, Nussenzweig V 1994. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids. *Europ J Biochem* 225: 333-339.
- Menezes MCND, Roitman I 1991. Nutritional requirements of *Blastocrithidia culicis*, a trypanosomatid with an endosymbiont. *J Protozool* 38: 122-123.
- Meyer H, De Souza W 1976. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. *J Protozool* 23: 385-390.
- Michener CD 1970. Diverse approaches to Systematics. *Evol Biol* 4: 1-38.
- Mickeych MF, Mitter C 1981. Treating polymorphic characters in Systematics: a phylogenetic treatment of electrophoretic data, pp. 45-58. In: VA Funk, DR Brooks (eds), *Advances in Cladistics. Proceedings of the first meeting of the Willi Hennig Society*, Allen

- Press, Lawrence.
- Migone LE 1916. Un nouveau flagellé des plantes: *Leptomonas Elmassiani*. *Bull Soc Path Éxot* 9: 356-359.
- Milder R, Camargo EP, Freymuller E 1990. Intracytoplasmic flagellum in trypanosomatids. *Europ J Protistol* 25: 306-309.
- Miles MA, Apt B W, Widmer G, Povoá MM, Schofield CJ 1984. Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 526-535.
- Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 221-237.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DJ 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225.
- Minter-Goedbloed E, Leake CJ, Minter DM, McNamara J, Kimber C, Bastien P, Evans DA, Le Ray D 1993. *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development *in vitro* and in insect hosts. *Parasitol Res* 79: 329-333.
- Minter-Goedbloed E, Pudney M, Kilgour V, Evans DA 1983. First record of a reptile trypanosome isolated from *Glossina pallidipes* in Kenya. *Z Parasitenkd* 69: 17-26.
- Miranda-Santos IKF, Pereira MEA 1984. Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. *Am J Trop Med Hyg* 33: 839-844.
- Molyneux DH, Croft SL, Lavin DR 1981. Studies on the host-parasite relationships of *Leptomonas* species (Protozoa: Kinetoplastida) of Siphonaptera. *J Nat Hist* 15: 295-406.
- Moraes RM, Freymuller E, Camargo EP, Milder R 1994. Development of trypanosomatids in the phytophagous insect *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A light and electron microscopic study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 553-559.
- Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast minicircles. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 77: 6810-6814.
- Morel CM, Deane MP, Gonçalves AM 1986. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today* 2: 94-101.
- Morel CM, Gonçalves AM, Simpson L, Simpson A 1984. Recent advances in the development of DNA hybridization probes for the detection and characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79 (Suppl): 51-53.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482.
- Motazedian H, Noyes H, Maingon R 1996. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. *Exp Parasitol* 83: 150-154.
- Motta MCM, Solé-Cava AM, Silva PMF, Fiorini JE, Soares MJ, De Souza W 1991. Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas angusteri*. *Can J Zool* 69: 571-577.
- Mühlpfordt H 1963. Über die bedeutung und feinstruktur des blepharoplasten bei parasitischen flagellaten. I. Teil. *Z Tropenmed Parasit* 14: 357-398.
- Mühlpfordt H 1975. Vergleichende kinetoplastmorphologie verschiedener trypanosomenarten unter besonderer berücksichtigung von *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasit* 26: 239-246.
- Mühlpfordt H 1981. Vergleichende elektronenmikroskopische untersuchung der kinetoplastmorphologie von fledermaustrypansomen und *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 65: 95-101.
- Mühlpfordt H, Berger J 1990. Characterization and grouping of *Trypanosoma cruzi* stocks by DNA base-specific fluorochromes and discriminant analysis. *Parasitol Res* 76: 319-325.
- Muller E, Ahomadegbe JC, Coulaud D, Gargani D, Fernandez-Becerra C, Dollet M 1995. Variability of kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for hartrot and marchitez diseases. *Phytopathology* 85: 942-947.
- Muller E, Gargani D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dollet M 1997. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitology* 115: 403-409.
- Muller E, Gargani D, Schaeffer V, Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M, Dollet M 1994. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Europ J Plant Pathol* 100: 425-434.
- Mundim MH, Roitman I 1977. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *J Protozool* 24: 329-331.
- Mundim MH, Roitman I, Hermans MA, Kitajima EW 1974. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *J Protozool* 21: 518-521.

- Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA 1992. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes* 6: 237-243.
- Nakamura CV, Esteves MJG, Andrade AFB, Alviano CS, De Souza W, Angluster J 1992. Cell surface saccharides in three *Phytomonas* species differing in host specificity. *J Protozool* 39: 303-309.
- Nakamura TU, Lopez CH, Yamada SF, Nakamura CV 1994. Glicoproteínas de superfície em *Crithidia deanei*: influência do endosimbionte. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 224.
- Nathans D, Smith HO 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu Rev Biochem* 44: 273-293.
- Nerad TA (ed) 1993. *American Type Culture Collection. Catalogue of Protists*, 18th ed., American Type Culture Collection, Rockville, 100 pp.
- Newton BA 1968. Biochemical peculiarities of trypanosomatid flagellates. *Annu Rev Microbiol* 22: 109-130.
- Newton BA 1976. Biochemical approaches to the taxonomy of kinetoplastid flagellates, pp. 405-434. In: WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 1, Academic Press, London.
- Newton BA, Horne RW 1957. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*. 1. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein. *Exp Cell Res* 13: 563-574.
- Nicoli RM, Penaud A, Timon-David P 1971a. Recherches systématiques sur les trypanosomides. I. Le genre *Nematodomonas* n. gen. *Bull Soc Zool France* 96: 405-415.
- Nicoli RM, Penaud A, Timon-David P 1971b. Recherches systématiques sur les trypanosomides. II. Le genre *Malacozoomonas* n. gen. *Bull Soc Zool France* 96: 415-419.
- Noc F, Stevenel L 1911. Présence à la Martinique de "*Leptomonas Davidi*" Lafont. *Bull Soc Pathol Exot* 4: 461-464.
- Noguchi H 1926. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. II. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. *J Exp Med* 44: 327-337.
- Noguchi H, Tilden EB 1926. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants. *J Exp Med* 44: 307-325.
- Novy FG, MacNeal WJ, Torrey HN 1907. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J Infect Dis* 4: 223-276.
- Noyes HA 1998. Can *Trypanosoma* trees be trusted? *Parasitol Today* 14: 49-50.
- Noyes HA, Chance ML, Croan DG, Ellis JT 1998. *Leishmania (Sauroleishmania)*: a comment on classification. *Parasitol Today* 14: 167.
- Nunes LR, Teixeira MMG, Camargo EP, Affonso HT 1994. kDNA and rDNA sequences reveal a phylogenetic cluster of species originally placed in different genera of trypanosomatids. *J Euk Microbiol* 41: 496-500.
- Nunes LR, Teixeira MMG, Camargo EP, Buck GA 1995. Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol* 74: 233-237.
- Nussenzweig V, Goble FC 1966. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp Parasitol* 18: 224-230.
- Ono CJ, Pinto FGS, Ueno CT, Kaneshima EN, Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S 1994. Physiological study of trypanosomatids isolated from nine different species of phytophagous Hemiptera. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 224.
- Ou YC, Giroud C, Baltz T 1991. Kinetoplast DNA analysis of four *Trypanosoma evansi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 46: 97-102.
- Pacheco RS, Bradão A, Sibajev A, Cupolillo E, Momen H, Degraeve W 1994. The genus *Crithidia* genotypic diversity among species. *J Protozool Res* 4: 71-82.
- Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H, Saravia NG 1995. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 69: 197-209.
- Pacheco RS, Marzochi MCA, Pires MQ, 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.
- Pacheco RS, Thomaz N, Brandão AA, Pires MQ, Momen H, Degraeve W 1996. A synthetic oligonucleotide probe that discriminates between the subgenera *Schizotrypanum* and *Megatrypanum*. *Parasite* 3: 297-299.
- Papavero N (organizador) 1994. Fundamentos práticos de taxonomia zoológica (coleções, bibliografia, nomenclatura), 2a edição, UNESP, São Paulo, pp. 285.
- Parr CW, Bagster IA 1974. Trypanosome taxonomy by electrophoretic characterization of enzymes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 147.
- Parthasarathy MV, Van Slobbe WG, Soudant C 1976. Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. *Science* 192: 1346-1348.
- Patton WS 1907. Preliminary note on the life cycle of a species of *Herpetomonas* found in *Culex pipiens*. *Brit Med J* 2: 78-80.
- Patton WS 1908. The life cycle of a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tract of *Gerris fossarum* Fabr. *Arch Protistenkd* 12: 131-146.
- Patton WS 1910a. *Rhynchomonas luciliae*, nov. gen.; nov. spec. A new flagellate parasitic in the

- malpighian tubes of *Lucilia serenissima* Walk. *Bull Soc Path Éxot* 3: 300-303.
- Patton WS 1910b. *Rhynchomonas luciliae*, nov. gen.; nov. spec. A new flagellate parasitic in the malpighian tubes of *Lucilia serenissima* Walk. *Bull Soc Path Éxot* 3: 433.
- Paulin JJ 1992. General comments on fixation of Protozoa for transmission electron microscopy, pp. C16.1-C16.2. In: JJ Lee, AT Soldo (eds), *Protocols in Protozoology*, Allen Press, Lawrence.
- Paulin JJ, McGhee RB 1971. An ultrastructural study of the trypanosomatid, *Phytomonas elmassiani*, from the milkweed, *Asclepias syriaca*. *J Parasitol* 57: 1279-1287.
- Peres RFC 1987. *Os RNAs ribossômicos dos tripanosomatídeos*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São Paulo, 135 pp.
- Peres RFC, Guimarães RC 1989. A phylogenetic tree for trypanosomatid cytology and ribosomal RNA size. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84 (Suppl II): 55.
- Pestov DG, Gladkaya LA, Maslov DA, Kolesnikov AA 1990. Characterization of kinetoplast minicircle DNA in the lower trypanosomatid *Crithidia oncopelti*. *Mol Biochem Parasitol* 41: 135-146.
- Petry K, Baltz Th, Shottelius J 1986. Differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. vespertilionis* by monoclonal antibodies. *Acta Trop* 43: 5-13.
- Petry K, Gargani D, Baltz T, Kastelein P, Dollet M 1989. Use of monoclonal antibodies for differentiation of different isolates of *Phytomonas* (plant trypanosomatids). *J Phytopathol* 126: 59-68.
- Petry K, Schottelius J, Dollet M 1987. Differentiation of *Phytomonas* sp. and lower trypanosomatids (*Herpetomonas*, *Crithidia*) by agglutination tests with lectins. *Parasitol Res* 74: 1-4
- Pires MQ, Fernandes O, Sousa MA, Pacheco R 1997. Nuclear and mitochondrial DNA analyses define groups of species in the genus *Crithidia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 187.
- Pires MQ, Sousa MA, Brandão AA, Momen H, Pacheco RS 1995. Genotypic diversity among species from the genera *Crithidia* and *Herpetomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (Suppl I): 280.
- Podlipaev SA 1986. *Phytomonas elmassiani* (Mastigophora: Trypanosomamonadida) from the plants *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in the Middle Asia and Kazakhstan. *Proc Zool Inst Acad Sci (Leningrad)* 144: 61-65 (em russo, sumário em inglês).
- Podlipaev SA 1990. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proc Zool Inst Acad Sci (Leningrad)* 217: 1-175.
- Podlipaev SA 1995. Plant trypanosome (Mastigophora: Trypanosomatidae) from *Cynanchum acutum* (Asclepiadaceae) plants in Northern Israel. *Phytoparasitica* 23: 351-353.
- Podlipaev SA 1999. Two new subspecies of trypanosomatids (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), parasites of bugs (Heteroptera) from Cuba and the United States, with a discussion of trypanosomatids of water striders (Heteroptera: Gerridae). *Zoosyst Ross* 8: 1-5.
- Podlipaev SA 2000. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 517-522.
- Podlipaev SA, Bulat SA 1998. Characterisation of trypanosomatids from insects and plants: UP-PCR (universally primed PCR) and cross hybridization of PCR products. *Proc Zool Inst Acad Sci (St. Petersburg)* 276: 155-160
- Podlipaev SA, Frolov AO 2000. Phylogeny of trypanosomatids: molecular and morphological researches. *Parasitologiya (St Petersburg)* 34: 169-182. (em russo, sumário em inglês)
- Podlipaev SA, Frolov AO, Kolesnikov AA 1990. *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a parasite of the bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera, Miridae). *Parasitologiya (Leningrad)* 24: 339-345. (em russo, sumário em inglês)
- Podlipaev SA, Lobanov AL 1996. The employing of measure characters for a discrimination of lower trypanosomatids. *Parasitologiya (St Petersburg)* 30: 324-332. (em russo, sumário em inglês).
- Podlipaev SA, Malysheva MN, Kolesnikov AA 1991. *Leptomonas rigidus* sp. n. (Trypanosomatidae) - a parasite of *Salda littoralis* L. (Hemiptera: Heteroptera). *Acta Protozool* 30: 121-127.
- Podlipaev SA, Mokrousov IV, Bulat SA 1998. Towards molecular systematics of trypanosomatids from insects by means of the polymerase chain reaction with universal primers (UP-PCR). *Parasitologiya (St Petersburg)* 32: 317-326.
- Podlipaev SA, Phylatov MV, Pantina KA 1991. A comparative determination of DNA-content in the lower trypanosomatids from Hemiptera of North-West of the USSR. *Parasitologiya (Leningrad)* 25: 250-256. (em russo, sumário em inglês)
- Podlipaev SA, Rokitskaya TA 1999. Classification of isolates of insect's trypanosomatids: isoenzyme analysis. *Parasitologiya (St Petersburg)* 33: 350-357. (em russo, sumário em inglês)
- Porter A 1909. The life-cycle of *Herpetomonas jaculum* (Léger), parasitic in the alimentary tract of *Nepa cinerea*. *Parasitology* 2: 367-391
- Pozio E, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M 1986. Hémoflagellés de *Tarentola mauritanica* L., 1758 (Reptilia, Gekkonidae), pp. 149-155. In: JA Rioux (ed), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Previato JO, Mendonça-Previato L, Lewanczuk RZ,

- Travassos LR, Gorin PAJ 1982. *Crithidia* spp.: structural comparison of polysaccharides for taxonomic significance. *Exp Parasitol* 53: 170-178.
- Prowazek von S 1904. *Herpetomonas*, einen mit den Trypanosomen verwandten Flagellaten (Vorläufige Mitteilung). *Arbei Kaiserlich Gesund (Berlin)* 20: 440-452.
- Rannala BH 1990. Genetic distance and parasite taxonomy. *J Parasitol* 76: 929-930.
- Ranque Ph, Nourrit J, Nicoli RM 1974. Recherches systématiques sur les trypanosomides. Les stades évolutifs chez les trypanosomides. *Bull Soc Path Exot* 67: 377-387.
- Ready PD, Miles MA 1980. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 207-211.
- Recinos RF, Kirchhoff LV, Donelson JE 1994. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol* 63: 59-67.
- Redman CA, Coombs GH 1997. The products and pathways of glucose catabolism in *Herpetomonas muscarum ingenoplastis* and *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J Eukaryot Microbiol* 44: 46-51.
- Reduth D, Schaub GA 1988. The ultrastructure of the cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al. 1971 (Trypanosomatidae): a freeze-fracture study. *Parasitol Res* 74: 301-306.
- Renger HC, Wolstenholme DR 1972. The form and structure of kinetoplast DNA of *Crithidia*. *J Cell Biol* 54: 346-364.
- Reuter-Filho A, Da Luz OJD, Seixas ASS, Miranda AMM, Cordeiro NS, Manaia AC 1997. Nutrition requirements of *Leptomonas* sp isolated from phytophagous insect. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 104.
- Ride WDL, Cogger HG, Dupuis C, Kraus O, Minelli A, Thompson FC, Tubbs PK (Editorial Committee) 1999. *International Code of Zoological Nomenclature*, 4th edition, ICZN, London, 306 pp.
- Riou F, Gutteridge WE 1978. Comparative study of kinetoplast DNA in culture, blood and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochimie* 60: 365-379.
- Riou G, Delain E 1969. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 62: 210-217.
- Riou G, Paoletti C 1967. Preparation and properties of nuclear and satellite deoxyribonucleic acid of *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol* 28: 377-382.
- Riou G, Pautrizel R 1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomes. *J Protozool* 16: 509-513.
- Riou G, Yot P 1975. Etude de l'ADN kinétoplastique de *Trypanosoma cruzi* à l'aide d'endonucléases de restriction. *C R Acad Sc Paris* 280 (Série D): 2701-2704.
- Riou GF, Saucier JM 1979. Characterization of the molecular components in kinetoplast-mitochondrial DNA of *Trypanosoma equiperdum*. *J Cell Biol* 82: 248-263.
- Riou JF, Dollet M, Ahomadegbe J-C, Coulaud D, Riou G 1987. Characterization of *Phytomonas* sp. kinetoplast DNA. A plant pathogenic trypanosomal species. *FEBS Lett* 213: 304-308.
- Rioux JA, Lanotte G, Maazoun R, Pasteur N 1985. L' électrophorèse des enzymes dans le genre *Leishmania* Ross, 1903. *Parassitologia* 27: 141-156.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pralong F, Bastien P, Perieres J 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65: 111-125.
- Rogers WE, Wallace FG 1971. Two new subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880. *J Protozool* 18: 645-649.
- Rogers WO, Wirth DF 1987. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84: 565-569.
- Roitman C, Roitman I, Azevedo HP 1972. Growth of an insect trypanosomatid at 37 C in a defined medium. *J Protozool* 19: 346-349.
- Roitman I, Brener Z, Roitman C, Kitajima EW 1976. Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvão, Oliveira, Carvalho & Veiga 1970, is a *Herpetomonas*. *J Protozool* 23: 291-293.
- Roitman I, Mundim MH, Azevedo HP, Kitajima EW 1977. Growth of *Crithidia* at high temperature: *Crithidia hutneri* sp. n. and *Crithidia luciliae thermophila* s. sp. n. *J Protozool* 24: 553-556.
- Romeiro A, Santos RFM, Cunha-e-Silva NL, Attias M, De Souza 1994. Morphological and growth variation of *Phytomonas* isolates cultivated in different media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 223.
- Romeiro A, Solé-Cava A, Sousa MA, De Souza W, Attias M 2000. Ultrastructural and biochemical characterization of prmastigotes and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. isolated from the intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J Euk Microbiol* 47: 208-220.
- Roubaud E 1908. Sur un nouveau flagellé, parasite de l'intestin des muscides, au Congo français. *C R Soc Biol* 64: 1106-1108.
- Roubaud E 1911a. *Cercoplasma* (n. gen.) *Caulleryi* (n. sp.); nouveau flagellé a formes trypanosomiennes de l'intestin d'*Auchmeromyia luteola* Fabr. (Muscide). *C R Soc Biol* 71: 503-505.
- Roubaud E 1911b. Phénomènes autogamiques chez les *Leptomonas* et formes affines; valeur sexuelle autogame des formes trypanosomiennes des leptomonades, et des formes leptomonadiennes des trypanosomes. *C R Soc Biol* 71: 602-605.
- Roubaud E 1911c. Sur un type nouveau de leptomonades intestinales des muscides,

- Leptomonas soudanensis* n. sp., parasite des pycnosomes Africains. *C R Soc Biol* 71: 570-573.
- Roubaud E 1912. Phénomènes autogamiques ét formes trypanosomiennes chez quelques flagellés de muscides africains. *C R Soc Biol* 72: 552-554.
- Ryan L, Lainson R, Shaw JJ 1987. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the rôle of *Psychodopygus welcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 353-359.
- Sá MFG, Sá CM, Veronese MA, Astolfi Filho S, Gander ES 1980. Morphologic and biochemical characterization of *Crithidia brasiliensis* sp. n. *J Protozool* 27: 253-257.
- Sá-Xavier C, Santos SM, Sousa MA 1998. A new trypanosomatid belonging to the genus *Crithidia* isolated from *Zelus leucogrammus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 95. (Anexo 7.3.7)
- Sabbatani S, Calzado AL, Ferro A, Goudlaby AML, Borghi V, Zanchetta GP, Varnier OE 1991. Atypical leishmaniasis in an HIV-2-seropositive patient from Guinea-Bissau. *AIDS* 5: 899-910.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Entrala E, Opperdoes FR, Dollet M, Osuna A 1995a. *In vitro* culture of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by ^1H NMR. *J Euk Microbiol* 42: 314-320.
- Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Mascaro C, Rosales MJ, Dollet M, Osuna A 1995b. Isolation, *in vitro* culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimolia*) in South-eastern Spain. *Parasitol Res* 81: 575-581.
- Sanchez-Moreno M, Lasztity D, Coppens I, Opperdoes FR 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Bioch Parasitol* 54: 185-200.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 74: 5463-5467.
- Santos RFM, Romeiro A, Attias M, De Souza W 1994. Reisolation of a *Phytomonas* sp. from *Chamaesyce thymifolia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 219.
- Sbravate C, Campaner M, Camargo LEA, Conchon I, Teixeira MMG, Camargo EP 1989. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous Hemiptera in Brazil. *J Protozool* 36: 543-547.
- Schaub GA, Schottelius J 1984. Identification of trypanosomes isolated from Reduviidae from North Chile. *Z Parasitenkd* 70: 3-9.
- Schildkraut CL, Mandel M, Levisohn S, Smith-Sonneborn JE, Marmur J 1962. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of some Protozoa. *Nature* 196: 795-796.
- Schildkraut CL, Marmur J, Doty P 1961. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J Mol Biol* 3: 595-617.
- Schottelius J 1982. The identification by lectins of two strain groups of *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 68: 147-154.
- Schottelius J, Koch O, Uhlenbruck G 1983. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and *Trypanosoma vespertilionis* Battaglia, 1904 by various lectins. *Tropenmed Parasit* 34: 89-92.
- Schottelius J, Marinkelle CJ, Gomez-Leiva MA 1986. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. *Tropenmed Parasit* 37: 54-58.
- Schottelius J, Müller V 1984. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. *Acta Trop* 41: 29-38.
- Schwartz DC, Cantor CR 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Segeren P, Jong R 1985. Inventory of possible insect vectors of Hartrot disease of coconut in Suriname. *De Surin Landb* 33: 21-28.
- Segura EL, Cazzulo JJ 1985. Antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 18 (Supl): 47-51.
- Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MM 1999a. *Phytomonas*: analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J Euk Microbiol* 46: 618-625.
- Serrano MG, Campaner M, Buck GA, Teixeira MMG, Camargo EP 1999b. 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.
- Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG 1999c. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol* 91: 268-279.

- Shaw JJ 1992. *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater?. *Ciênc Cult* 44: 107-116.
- Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR 1987. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 69-72.
- Sibajev A, Pacheco RS, Soares MJ, Cupolillo E, Santos AB, Momen H 1993. *Crithidia ricardoii* sp. n. a new species of Trypanosomatidae isolated from *Culex saltanensis* Dyar, 1928 (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 541-545.
- Simpson L 1972. The kinetoplast of the hemoflagellates. *Int Rev Cytol* 82: 139-207.
- Simpson L 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid Protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41: 363-382.
- Slowinski JB, Page RDM 1999. How should species phylogenies be inferred from sequence data? *Syst Biol* 48: 814-825.
- Smith HO 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205: 455-462.
- Smith HO, Wilcox KW 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51: 379-391.
- Sneath PHA, Sokal RR 1962. Numerical taxonomy. *Nature* 193: 855-860.
- Sneath PHA, Sokal RR 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*, WH Freeman & Co., San Francisco.
- Soares MJ, Brazil RP, Tanuri A, De Souza W 1986. Some ultrastructural aspects of *Crithidia gui-lhermei* n. sp. isolated from *Phaenicia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Can J Zool* 64: 2837-2842.
- Soares MJ, De Souza MF, De Souza W 1987. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J Protozool* 34: 199-203.
- Soares MJ, De Souza W 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 20: 349-361.
- Sousa MA 1991. Growth and differentiation of *Angomonas deanei* (*Crithidia deanei*). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33 (Suppl 8): S9.
- Sousa MA 1994a. Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Res* 80: 112-116. (Anexo 7.1.1)
- Sousa MA 1994b. Trypomastigotes in cultures of *Blastocrithidia culicis* (Novy, MacNeal & Torrey, 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 111-112. (Anexo 7.1.2)
- Sousa MA 1997. Cytological findings suggesting sexuality in *Phytomonas davidi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 165-170. (Anexo 7.1.3)
- Sousa MA 1999. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (Suppl I): 205-210. (Anexo 7.1.6)
- Sousa MA, Barrett TV, Naiff RD, Branco DCB, Sá-Xavier C, Santos SM, Cysne L, Brandão A 1998a. *Leptomonas* sp. isolated from the sandfly *Lutzomyia ayrozai* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 127. (Anexo 7.3.10)
- Sousa MA, Camargo AC, Campelo AGS, Abrantes J, Sá-Xavier C, Brazil RP, Tavares CC 1996. Molecular karyotype analysis of lower trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 102. (Anexo 7.3.5)
- Sousa MA, Camargo AC, Costa KCF 1994a. Differentiation to opisthomastigote in trypanosomatids allocated in the genus *Crithidia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 224. (Anexo 7.3.1)
- Sousa MA, Camargo AC, Costa KCF, Tavares CC, Deane MP 1994b. Molecular karyotype of lower trypanosomatids: genus *Crithidia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 (Suppl I): 253. (Anexo 7.3.2)
- Sousa MA, Côrte-Real S 1991. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33 (Supl 8): S8.
- Sousa MA, Costa KCF, Camargo AC, Santos SM, Ziccardi M, Freschi JM, Attias M 1995. Characterization of a trypanosomatid isolated from *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (Suppl I): 246. (Anexo 7.3.3)
- Sousa MA, Madeira MF, Cupolillo E, Santos SM, Sá-Xavier C, Soares MJ, Brazil RP 1998b. Characterization of a *Herpetomonas* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Nectomys squamipes* (Mammalia: Rodentia). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 101. (Anexo 7.3.9)
- Sousa MA, Pereira MCS, Chebabo R, Brazil RP 1997a. Morphological features suggesting a sexual process in a trypanosomatid of the genus *Herpetomonas*. *Europ J Protistol* 33: 356-359. (Anexo 7.1.4)
- Sousa MA, Pereira MCS, Côrte-Real S 1997b. *Leishmania major*: parasite interactions suggesting sexuality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 761-766. (Anexo 7.1.5)
- Sousa MA, Sá-Xavier C, Santos SM, Branco DCB 1997c. Cellular differentiation in trypanosomatids isolated from plants: usefulness of morphological characters to identify *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 85. (os erros que surgiram neste trabalho não são dos autores)
- Sousa MA, Sá-Xavier C, Santos SM, Branco DCB 1998c. Cellular differentiation in trypanosomatids

- isolated from plants: usefulness of morphological characters to identify *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 221-222. (Anexo 7.3.11; errata do artigo acima).
- Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Branco DCB 1998d. Cellular differentiation and growth in axenic culture of trypanosomatids allocated in the genus *Leptomonas* (Protozoa: Kinetoplastida). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 100. (Anexo 7.3.8)
- Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Branco DCB 1998e. The *Leptomonas* genus analysed by morphobiological parameters: taxonomic implications. *Phytomonas Newsletter* 18: 4. (Anexo 7.3.12)
- Sousa MA, Tavares CC, Fiorini JE, Sá-Xavier C, Campêlo AG, Santos SM, Cucolichio G 1997d. *Herpetomonas* from plants and phytophagous hemipterans: are some *Herpetomonas* spp. heteroxeneous? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Suppl I): 130. (Anexo 7.3.6)
- Souto RP, Zingales B 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 62: 45-52.
- Souza MC, Reis AP, Dias-da-Silva W, Brener Z 1974. Mechanism of acquired immunity induced by "*Leptomonas pessoai*" against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Protozool* 21: 579-584.
- Spithill TW, Grumont RJ 1984. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Mol Biochem Parasitol* 12: 217-236.
- Stahel G 1931. Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (Phloëmnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. 1. Mikroskopische untersuchungen und infektionsversuche. *Phytopathol Z* 4: 65-82.
- Stahel G 1933. Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (Phloëmnekrose) des kaffeebaumes in Surinam (III). *Phytopathol Z* 6: 335-357.
- Steiger RF, Steiger E 1977. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requeriments. *J Protozool* 24: 437-441.
- Steindel M, Dias-Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60: 71-80.
- Steindel M, Dias-Neto E, Pinto CJC, Grisard EC, Menezes CLP, Murta SMF, Simpson AJG, Romanha AJ 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Euk Microbiol* 41: 261-267.
- Stevens J 2000. The Trypanosomatid Evolution Workshop London School of Hygiene and Tropical Medicine 17-18 February 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 507-508.
- Stevens JR, Godfrey DG 1992. Numerical taxonomy of *Trypanozoon* based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology* 104: 75-86.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC 1999. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118: 107-116.
- Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA 1998. On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. *Parasitology* 117: 243-247.
- Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA 2000. Analysis of genetic diversity of *Trypanosoma cruzi*: an application of riboprinting and gradient gel electrophoresis methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 545-551.
- Strickland C 1911. Description of a *Herpetomonas* parasitic in the alimentary tract of the common green-bottle fly, *Lucilia* sp. *Parasitology* 4: 222-236.
- Stuart K 1991. RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. *Trends Biochem Sci* 16: 68-72.
- Stuart K, Feagin JE 1992. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol* 141: 65-88.
- Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 33: 205-214.
- Sturm NR, Fernandes O, Campbell DA 1995. The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiol Lett* 130: 177-182.
- Swellengrebel NH 1911. Note on the morphology of *Herpetomonas* and *Crithidia*, with some remarks on "physiological degeneration". *Parasitology* 4: 108-130.
- Takata CSA, Camargo EP, Milder RV 1996. Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas*. *Europ J Protistol* 32: 90-95.
- Takehara HA, Dias-da-Silva W 1976. Mechanism of resistance against *T. cruzi* in animals vaccinated with *L. pessoai*. *PAHO Scient Publ* 318: 174-178.
- Takeuchi AM, Traub-Cseko YM 1991. Development of nuclear DNA probes for the typing of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 307-315.
- Tavares CC, Grimaldi Jr G, Traub-Cseko Y 1992. Molecular karyotype analysis and mapping of housekeeping genes to chromosomes of selected species complexes of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 477-486.
- Tavares-da-Silva JB, Roitman I 1990. Growth of *Phytomonas serpens* in a defined medium; nutritional requirements. *J Protozool* 37: 521-523.
- Taylor AER, Baker JR 1968. *The Cultivation of Parasites "In Vitro"*, pp. 3-51, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Taylor AER, Edwards YH, Smith V, Baker JR, Woo

- PTK, Lanham SM, Pennick NC 1982. *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) species from insectivorous bats (Microchiroptera): characterization by polypeptide profiles. *Syst Parasitol* 4: 155-168.
- Taylor AER, Edwards YH, Smith V, Miles MA, Gibson WC 1983. The polypeptide profiles of strains of the *Trypanosoma* subgenera *Schizotrypanum* and *Trypanozoon*: peptideme characterization. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 354-362.
- Taylor AER, Williams JE 1977. The possibility of characterizing South American trypanosomes with sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 75: XXIII.
- Teixeira MMG, Camargo EP 1989. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Protozool* 36: 262-264.
- Teixeira MMG, Campaner M, Camargo EP 1994. Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA. *Parasitol Res* 80: 512-516.
- Teixeira MMG, Serrano MG, Camargo EP 2000. New data from old trypanosomatid preparations. *Parasitol Today* 16: 261-263.
- Teixeira MMG, 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 MMG, Takata CSA, 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* 83: 58-65.
- Telford Jr SR 1995. The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles, pp. 161-223. In: JP Kreier (ed), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., vol 10, Academic Press, San Diego.
- Thomson JG, Robertson A 1932. The relationship of certain plant and insect flagellates to the sub-genus *Strigomonas* M. and A. Lwoff, 1931. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 25: 287-291.
- Tibayrenc M 1980. Application of the calculations of genetic distances for flagellate systematics. *O.R.S.T.O.M. (série Ent Méd Parasitol)* 18: 301-302.
- Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.
- Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M 1981. Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *C R Acad Sc Paris* 292 (Série III): 623-625.
- Tibayrenc M, Le Ray D 1984. General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and comparison with *T. (S.) marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. *Ann Soc Belge Med Trop* 64: 239-248.
- Skarecky D, Ayala FJ 1993. Genetic characterization of six parasitic Protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90: 1335-1339.
- Tielens AGM, Van Hellemond JJ 1998. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today* 14: 265-271.
- Tieszen KL, Molyneux DH, Abdel-Hafez SK 1989. Host-parasite relationships and cysts of *Leptomonas lygaei* (Trypanosomatidae) in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Parasitology* 98: 395-400.
- Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC 2000. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding β -tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (aceito para publicação).
- Toyé PJ 1974. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 147.
- Travi BL, Zea A, D'Alessandro A 1989. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *leuwenhoeki* in *Choloepus hoffmanni* and *Didelphis marsupialis* of the Pacific Coast of Colombia. *J Parasitol* 75: 218-224.
- Uliana SRB, Affonso MHT, Camargo EP, Floeter-Winter LM 1991. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol* 72: 157-163.
- Uttaro AD, Mirkin N, Rider MH, Michels PAM, Opperdoes FR 1999. *Phytomonas* sp. as model of trypanosomatid metabolism and drug design. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl II): 22.
- Uttaro AD, Opperdoes FR 1997. Purification and characterisation of a novel *iso*-propanol dehydrogenase from *Phytomonas* sp. *Mol Biochem Parasitol* 85: 213-219.
- Vainstein MH, Roitman I 1986. Cultivation of *Phytomonas françai* associated with poor development of root system of cassava. *J Protozool* 33: 511-513.
- Vainstein MH, Tavares-da-Silva JB, Gonçalves-de-Lima VMQ, Roitman I, De Souza W, Dollet M, Camargo EP 1987. Electrophoretic analysis of isoenzymes in the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Protozool* 34: 442-444.
- Vallejo GA, Chiari E, Macedo AM, Pena SDJ 1993. A simple laboratory method for distinguishing between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 165-166.
- Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. *Mol Biochem Parasitol* 67: 245-253.
- Van der Ploeg LHT, Cornelissen AWCA, Barry JD, Borst P 1984. Chromosomes of Kinetoplastida. *EMBO J* 3: 3109-3115.

- Vermeulen H 1963. A wilt of *Coffea liberica* in Surinam and its association with a flagellate, *Phytomonas leptovasorum* Stahel. *J Protozool* 10: 216-222.
- Vickerman K 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates, pp. 1-34. In: WRL Lumsden, DE Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, New York.
- Vickerman K 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Brit Med J* 41: 105-114.
- Vickerman K 1990. Phylum Zoomastigina: Class Kinetoplastida, pp. 215-238. In: L Margulis, JO Corliss, M Melkonian, D Chapman (eds), *Handbook of Protoctista*, Jones & Bartlett, Boston.
- Vickerman K 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-1331.
- Vickerman K 1995. Cellular organisation and developmental cycles of trypanosomatid flagellates. In *Phytomonas in their Newly Discovered Role as Plant Pathogens*, BEMET Course, Granada. (artigo 2).
- Vickerman K, Preston TM 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates, pp. 35-130. In: WRL Lumsden, DE Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 1, Academic Press, New York.
- Villalba E, Dorta B, Ramirez JL 1985. Comparative study of the ribosomal RNA from *Leishmania* and *Trypanosoma*. *J Protozool* 32: 49-53.
- Vitetta E, Guttman HN 1967. Immunological relationships among the lower Trypanosomatidae. *J Gen Microbiol* 48: 45-52.
- Waitumbi JN, Murphy NB 1993. Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. *Mol Biochem Parasitol* 58: 181-186.
- Wallace FG 1943. Flagellate parasites of mosquitoes with special reference to *Crithidia fasciculata* Léger, 1902. *J Parasitol* 29: 196-205.
- Wallace FG 1962. The trypanosomatid parasites of horseflies with the description of *Crithidia rileyi* n. sp.. *J Protozool* 9: 53-58.
- Wallace FG 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol* 18: 124-193.
- Wallace FG 1977a. Developmental stages of trypanosomatids flagellates: a new terminology revisited. *Protozoology* 3: 51-56.
- Wallace FG 1977b. *Leptomonas seymouri* sp. n. from the cotton stainer *Dysdercus suturellus*. *J Protozool* 24: 483-484.
- Wallace FG 1979. Biology of the Kinetoplastida of arthropods, pp. 213-240. In: WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 2, Academic Press, London.
- 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 1959. Flagellate parasites of the fly, *Phaenicia sericata* (Meigen). *J Protozool* 6: 58-61.
- 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, Hertig M 1968. Ultrastructural comparison of promastigote flagellates (leptomonads) of wild-caught Panamanian *Phlebotomus*. *J Parasitol* 54: 606-612.
- Wallace FG, Johnson A 1961. The infectivity of old cultured strains of mosquito flagellates. *J Insect Pathol* 3: 75-80.
- Wallace FG, Roitman I, Camargo EP 1992. Trypanosomatids of plants, pp. 55-84. In: JP Kreir, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., vol 2, Academic Press, San Diego.
- Wallace FG, Todd SR 1964. *Leptomonas mirabilis* Roubaud 1908 in a Central American blowfly. *J Protozool* 11: 502-505.
- Wallace FG, Todd SR, Rogers W 1965. Flagellate parasites of waters striders with a description of *Leptomonas costoris*, n. sp. *J Protozool* 12: 390-393.
- Wallace FG, Wagner M, Rogers WE 1973. Varying kinetoplast ultrastructure in two subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy). *J Protozool* 20: 218-222.
- Wallbanks KR, Maazoun R, Canning EU, Rioux JA 1985. The identity of *Leishmania tarentolae* Wenyon 1921. *Parasitology* 90: 67-78.
- Weinman D 1972. *Trypanosoma cyclops* n. sp.: a pigmented trypanosome from the Malayan primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 628-636.
- Weinman D, Cheong WH 1978. *Herpetomonas*, with bacterium-like inclusions, in Malaysian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Protozool* 25: 167-169.
- Welsh J, McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7214-7218.
- Wenyon CM 1913. Observations on *Herpetomonas muscae domesticae* and some allied flagellates. *Arch Protistenkd* 31: 1-36.
- Wenyon CM 1926. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*, vol 1, pp. 155-468, Baillière, Tindall & Cox, London.
- Wertlieb DM, Guttman HN 1963. Catalase in insect trypanosomatids. *J Protozool* 10: 109-112.
- Wiley EO 1981. *Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*, Wiley-Liss, New York, 439 pp.
- Wille Jr JJ, Weidner E, Steffens WL 1981. Intranuclear parasitism of the ciliate *Euplotes* by a trypanosomatid flagellate. *J Protozool* 28: 223-227.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified

- by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Woo PTK & Soltys MA 1972. Indirect haemagglutination test with sera of animals experimentally infected with *Trypanosoma brucei* and *T. rhodesiense*. *Z Tropenmed Parasit* 23: 166-172.
- Woodcock HM 1914a. Further remarks on the flagellate parasites of *Culex*. Is there a generic type, *Crithidia*? *Zool Anz* 44: 26-33.
- Woodcock HM 1914b. On "*Crithidia*" *fasciculata* in hibernating mosquitoes (*Culex pipiens*) and the question of the connection of this parasite with a trypanosome. *Zool Anz* 43: 370-382.
- Wright ADG, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH 1999. Phylogenetic position of kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 99: 69-76.
- Yoshida N, Camargo EP 1978. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. *J Bacteriol* 136: 1184-1186.
- Yoshida N, Freymuller E, Wallace FG 1978a. *Herpetomonas mariadeanei* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) from *Muscina stabulans* (Fallén, 1816) (Diptera, Muscidae). *J Protozool* 25: 421-425.
- Yoshida N, Jankevicius JV, Roitman I, Camargo EP 1978b. Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*. *J Protozool* 25: 550-555.
- Zimmermann D, Peters W, Schaub GA 1987. Differences in binding of lectin-gold conjugates by *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the intestine of *Triatoma infestans* (Reduviidae). *Parasitol Res* 74: 5-10.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 28: 105-112.
- Zotta G 1923. A propos de l'action favorisante du sang sur le développement du *Leptomonas pyrrocoris* dans la bouillon glucosé. *C R Soc Biol* 88: 913-915.

7. ANEXOS

**Artigos científicos publicados e relacionados/afins aos temas da tese
(1994-2000)**

Sousa MA 1994. Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in <i>Herpetomonas megaseliae</i> (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). <i>Parasitology Research</i> 80: 112-116	7.1.1
Sousa MA 1994. Trypomastigotes in cultures of <i>Blastocrithidia culicis</i> (Novy, MacNeal & Torrey, 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 89: 111-112	7.1.2
Sousa MA 1997. Cytological findings suggesting sexuality in <i>Phytomonas davidi</i> (Protozoa: Kinetoplastida). <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 92: 165-170	7.1.3
Sousa MA, Pereira MCS, Chebabo R, Brazil RP 1997. Morphological features suggesting a sexual process in a trypanosomatid of the genus <i>Herpetomonas</i>. <i>European Journal of Protistology</i> 33: 356-359	7.1.4
Sousa MA, Pereira MCS, Côrte-Real S 1997. <i>Leishmania major</i>: parasite interactions suggesting sexuality. <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 92: 761-766	7.1.5
Sousa MA 1999. Morphobiological characterization of <i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 94 (Suppl I): 205-210	7.1.6
Brandão AA, Miranda A, Degraeve WM, Sousa MA 2000. The heteroneneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. <i>Parasitology Research</i> 86: 809-812	7.1.7

M. A. Sousa

Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

Received: 9 July 1993 / Accepted: 15 September 1993

Abstract Giemsa-stained smears of *Herpetomonas megaseliae* cultures in LIT medium displayed on several occasions not only the typically dividing promastigotes but also pairs of apposed parasites attached by their posterior ends, where a cellular enlargement and a ring-like border generally occurred; other pairs formed by an elongated promastigote and a bell-shaped cell were also found. In both cases, either each of the joined cells could have its own nucleus or one of them was anucleate and the other presented two nuclei that were sometimes so close that they appeared to be a single nucleus. These findings, along with others seeming to be intermediate steps between them, strongly suggested that a sexual process, involving parasite union followed by nuclear migration from one cell to the other and then by fusion, was taking place in such cultures.

Introduction

The existence of sexual reproduction in trypanosomatids is an entirely open question, primarily on account of the lack of classic cytological evidence of meiosis and fertilization. Several previous statements of its occurrence have not been convincingly proven (Wenyon 1926; Wenrich 1954; Noble 1955; Walker 1964; Hoare 1972), and ulterior findings suggesting parasite fusion and an opportunity for genetic exchange (Deane and Milder 1966; Brener 1972; Abe 1980; Nyindo et al. 1981; Evans and Ellis 1983; Skarlato and Malysheva 1987) require confirmation.

The first evidence of the occurrence of sexuality in trypanosomatids was obtained indirectly from the analysis of enzyme electrophoretic variants in natural populations of *Trypanosoma brucei* and some *Leishmania* species (Gibson et al. 1980; Tait 1980; Maazoun et al. 1981; Le Blank et al. 1983). Subsequently, several work-

ers employing techniques of molecular genetics demonstrated that hybridization in fact occurs in *T. brucei* following experimental crosses between well-characterized cloned populations and that it is not obligatory in the parasite's life cycle (reviewed by Tait and Turner 1990); however, sexual stages remain unknown. Likewise, further support has been given to the hypothesis of sexuality in *Leishmania* (Le Blank and Peters 1986; Evans et al. 1987; Kelly et al. 1991; Cupoillo et al. 1992), but it has not been experimentally proven (Evans et al. 1989; Pantón et al. 1991; Shehata et al. 1991), although Lanotte and Rioux (1990) have demonstrated promastigote fusion in *L. infantum* and *L. tropica* through videocinematography. Moreover, claims for genetic recombination in *Crithidia fasciculata* have been made by Glassberg et al. (1985) following laboratory crosses between mutants differing in drug resistance.

From this brief review it becomes clear that many gaps remain in our knowledge of trypanosomatid sexuality, either at the level of molecular genetics or regarding the cytological grounds of the phenomenon. Thus, the present paper approaches this subject, describing several morphological features observed in cultures of an insect trypanosomatid, *Herpetomonas megaseliae* Dagget, Dollahon and Janovy Jr., 1972, which are hardly understood as parasite division but otherwise suggest a sexual process.

Materials and methods

Herpetomonas megaseliae cultures (ATCC 30209) supplied by Dr. E.P. Camargo (São Paulo University, Brazil) were regularly maintained in LIT medium (Camargo 1964) either at room temperature or constantly at 27.3° C. Generally between the 4th and 7th days of cultivation, fresh preparations were observed under the light microscope. Following the finding of pairs of apposed parasites, smears of the culture were also prepared. After methanol fixation, these smears were treated with 5 N HCl for 10–20 min and were subsequently washed and stained for at least 1 h with a Giemsa solution diluted (1–2 drops/ml) in phosphate buffer (0.02 M, pH 7.2; Carvalho 1973). Photomicrographs were taken of the features observed in the stained preparations and were subse-

M. A. Sousa
Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz,
Cx.P. 926,
20001-970 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESEARCH NOTE

**Trypomastigotes in Cultures of
Blastocrithidia culicis (Novy,
MacNeal & Torrey, 1907)
(Kinetoplastida:
Trypanosomatidae)**

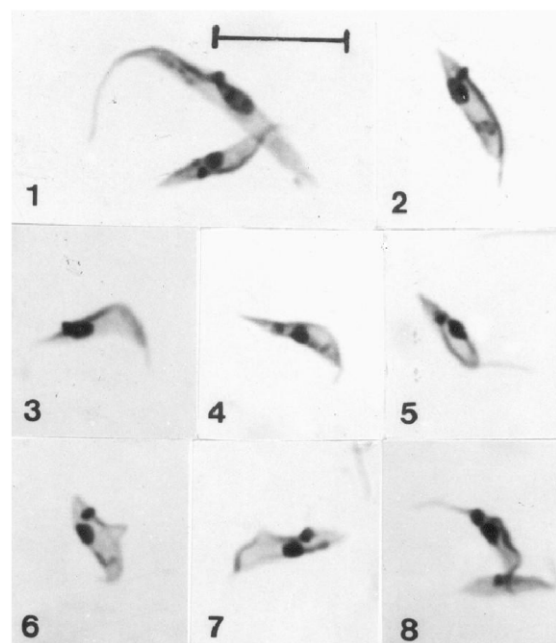
Maria Auxiliadora de Sousa

Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz,
Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Key words: trypomastigotes – *Blastocrithidia culicis*

Arthropod trypanosomatids of the genus *Blastocrithidia* Laird, 1959 typically present the epimastigote stage, being largely accepted that their development never goes beyond this, although some species display amastigote stages as flagellar cysts (M Laird 1959 *Can J Zool* 37: 749-752, CA Hoare & FG Wallace 1966, *Nature* 212: 1385-1386, K Vickerman 1976, p. 1-34. In DHR Lumsden & DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida* vol. I, Academic Press, New York). Among the species of the genus, *Blastocrithidia culicis* (Novy, MacNeal & Torrey, 1907) has been much studied on account of two related features: its easy cultivation and the presence of bacterium-like symbionts in its cytoplasm (K-P Chang 1975 *J Protozool* 22: 271-276). In our laboratory, a strain of this species (ATCC 30268) isolated from *Aedes vexans* by FG Wallace & A Johnson (1961 *J Insect Path* 3: 75-80) and supplied by Dr EP Camargo (São Paulo University, SP, Brazil) has been routinely maintained in the Yeager's LIT medium (EP Camargo 1964 *Rev Inst Med trop São Paulo* 6: 93-100), either at room temperature or constantly at 27.3 °C. On examining Giemsa-stained smears of these cultures, a trypomastigote stage was found in several opportunities, from the 8th to the 21st cultivation days. Such trypomastigotes occurred at rates ranging from 0.8 to 18.7% (more commonly 2-7%), being considerably smaller than the epimastigotes and generally presenting an inconspicuous undulating membrane and a short flagellum (see Figs). It has been proved that such trypomastigotes in fact belong to *B. culicis*

by cloning the parasite culture in a flow cytometer (Coulter's EPICS 751), since they were found in eleven randomly selected clones. Trypomastigotes were also seen in cultures of an aposymbiotic strain of this parasite (ATCC 30257), suggesting that their occurrence is unrelated to the symbiont presence.



Blastocrithidia culicis culture forms (symbiont-bearing strain). Giemsa stain after HCl treatment according to ALM Carvalho (1973 *Rev Pat Trop* 2: 223-274). Fig. 1: epimastigote and trypomastigote side-to-side for comparison. Figs 2-3: transitional forms between epi- and trypomastigote. Figs 4-8: trypomastigotes. All photomicrographs at same magnification (scale bar = 10 µm).

As far as I know, the presence of trypomastigotes in *B. culicis* cultures had not been previously demonstrated. Early descriptions of this species did not include this stage (FG Novy et al. 1907 *J Infect Dis* 4: 223-276, D Mezincesco 1908 *C R Soc Biol* 64: 975-976, Wallace & Johnson *loc. cit.*, FG Wallace 1966 *Exp Parasitol* 18: 124-193). Other reports in culicids of morphological types capable of being identified as epi and trypomastigotes (sometimes both in the same insect) (A Laveran & G Franchini 1920 *Bull Soc Path Exot* 13: 138-147, A Missiroli 1930 *Riv Malariol* 9: 111-119) cannot be surely assigned to *B. culicis* mainly accounting that, in such cases, no symbiont-like organelles (the so called "diplosome" typical of this species) were mentioned and mixed infections were also possible, furthermore regarding that culicids can support the development and multiplication of trypanosomes from different vertebrates (JE

Received 1 June 1993

Accepted 6 January 1994

Bardsley & R Harmsen 1973 *Adv Parasitol* 11: 1-73, JR Baker 1976 p. 131-174. In Lumsden & Evans (eds) *loc. cit.*).

At present, the meaning of such finding has not been determined, but taking into account the ability of *B. culicis* to differentiate into trypomastigote and its isolation from bloodsucking insects (Novy et al. *loc. cit.*, Mezincesco *loc. cit.*), the possibility of its being a *Trypanosoma* species is one that should be considered. This hypothesis had been already advanced by HM Woodcock (1914 *Zool Anz* 44: 26-33) and even verified by Novy et al. (*loc. cit.*) and Mezincesco (*loc. cit.*), both obtaining negative results throughout inoculations into several vertebrates. However, these experiments cannot be considered conclusive, since these authors did not report the presence of trypomastigotes in the inoculum (the possible infective forms) and could have employed unsusceptible hosts in their experiments. Moreover, as several *Trypanosoma* species only produce scanty parasitemia, their presence cannot be easily evidenced, accounting for negative results (CA Hoare 1972 *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph*. Blackwell Sc. Publ., Oxford and Edinburg, V Apanius 1991 *Parasitol Today* 7: 87-90). Then, studies will be undertaken to verify the infectivity to different vertebrates of *B. culicis* cultures presenting trypomastigotes. Furthermore, the occurrence of this stage

in experimentally infected culicids will be investigated.

It must be emphasized that the possibility of *B. culicis* being exclusively an insect parasite has not been rejected. This being true, the diagnosis of the genus *Blastocrithidia* proposed by Laird (*loc. cit.*) should be reviewed according to Wallace (*loc. cit.*) that also allowed the occurrence of individuals with postnuclear kinetoplast. However, the species presenting trypomastigotes included by Wallace (*loc. cit.*) in the genus *Blastocrithidia* (*B. anophelis* and *B. pessoai*) were also found in culicids and likewise the possibility of they being stages of some trypanosome cannot be ruled out. This view had been already advanced by Missiroli (*loc. cit.*) in the case of "*Crithidia*" *anophelis* (= *B. anophelis*).

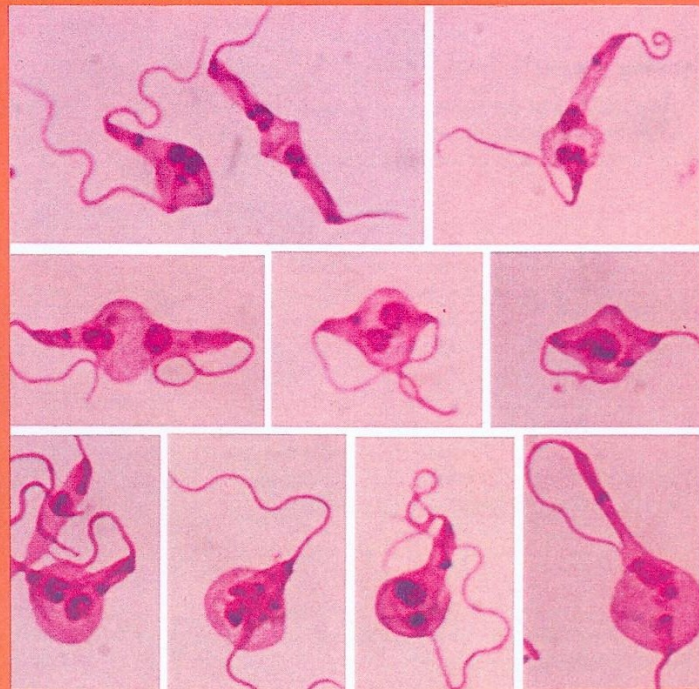
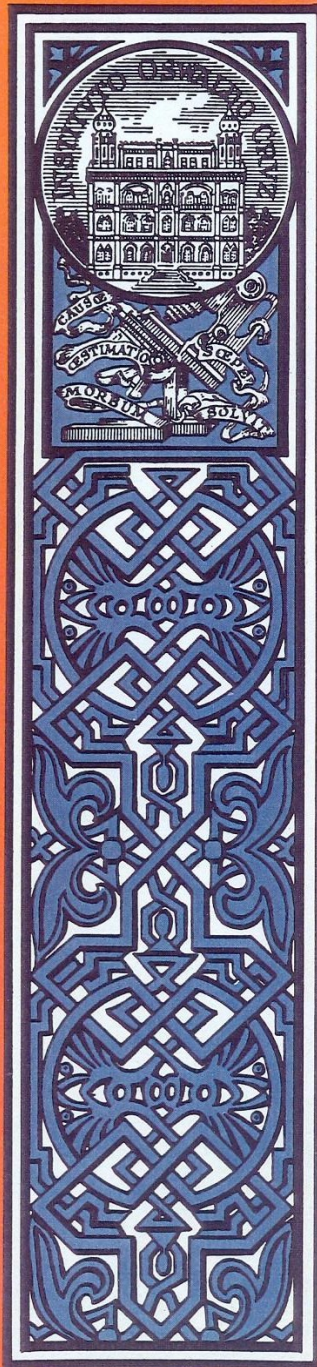
Trypomastigotes in monoxenous trypanosomatids were also reported in the genus *Rhynchoidomonas* Patton, 1910, a poorly known group of parasites of the Malpighian tubules and intestine of nonhematophagous Diptera (review by Wallace *loc. cit.*). Despite the presence of trypomastigotes in cultures of *B. culicis*, with the data now at hand, it is not possible to establish any relationship between it and the *Rhynchoidomonas* species.

Acknowledgements: to Mrs Celeste da Silva Freitas de Souza for her assistance, to Dr Alvaro Bertho for operating the flow cytometer and to Dr Ortrud Monika Barth for allowing the photomicrographs to be taken at her laboratory.

Vol. 92 (2) Mar./Apr. 1997

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research



Cytological Findings Suggesting Sexuality in *Phytomonas davidi* (Protozoa: Kinetoplastida)

Maria Auxiliadora de Sousa

Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

On few occasions, Phytomonas davidi (McGhee & Postell isolate) cultures in LIT (liver infusion-tryptose) medium around 27°C presented, as seen in Giemsa-stained smears, a set of peculiar morphological features, among them being noticeable the pairs of apposed cells attached by their posterior ends, where occurred a stained line and/or a dilatation, usually bulb-like in shape; sometimes this dilatation could occupy one of the cells or hold both together. In some pairs, the nucleus of each parasite seemed migrating towards the other, entering into such dilatation; in others, both nuclei were inside it, sometimes in close proximity or seeming fused; peculiar chromatin arrangements involving both nuclei were occasionally observed. Several mono or binucleate round forms bearing one or two flagella, as well as flagellate slender cells without nucleus were concomitantly seen there. In some instances, an intriguing small stained body occurred beside a single large nucleus, either in pairs presenting the bulb-like structure or in round cells. These cytological findings seemed steps of a dynamic process suggesting sexuality, since in several of them nuclear interactions following fusion of two parasites appeared to occur.

Key words: trypanosomatid - *Phytomonas davidi* - morphology - sexuality

The increasing use of biochemistry and molecular biology techniques in the study of trypanosomatids has provided substantial amount of data suggesting sexuality, as in some *Leishmania* species (Maazoun et al. 1981, Le Blancq et al. 1983, Kelly et al. 1991, Cupolillo et al. 1992, Belli et al. 1994), or even proving it, as in *Trypanosoma brucei* (Jenni et al. 1986, Tait & Turner 1990, Gibson & Bailey 1994, Degen et al. 1995). Genetic recombination has also been reported in *Crithidia fasciculata* (Glassberg et al. 1985) following crosses between cloned populations differing in drug-resistance. Nevertheless, the morphological grounds of such findings have not yet been established and the first record of parasite fusion was given by Lanotte and Rioux (1990) on studying cultured promastigotes of *L. infantum* and *L. tropica* by videocinematography. Sousa (1994) also reported cytological events in cultures of *Herpetomonas megaseliae* strongly suggesting cell and nucleus fusion; similar phenomenon was also reported in *L. major* under unusual culture conditions (Sousa et al. 1993). The results presented herein were casually found in axenic cultures of *Phytomonas davidi*, isolate of McGhee and Postell

(1976), a trypanosomatid whose taxonomic position has been frequently discussed (Camargo et al. 1992), although its generic name remains in use (Wallace et al. 1992). The phenomenon described strongly suggests a sexual process, since morphological grounds for genetic exchange appear present, although at the level of this study this could not be demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

The strain of *P. davidi* (ATCC 30287) used throughout this study was kindly supplied by Dr Erney P Camargo (São Paulo University, Brazil) on April 1991 and upon receipt was maintained in the Yaeger's liver infusion-tryptose (LIT) medium (Chiari & Camargo 1984) containing penicillin (200 U/ml) and distributed in 4-5 ml volumes into 16x150mm screwcap tubes. Cultures were kept at nearly 27°C and passed at 7-9 day intervals. Following the finding of unusual features in fresh preparations of 4-9 day old cultures, smears were prepared, fixed with methanol, treated with HCl 5N (10-20 min), subsequently washed and stained during 1 hr with phosphate-buffered Giemsa solution (pH 7.2) (Carvalho 1973). These stained smears were studied by light microscopy at X 1,000 magnification and photographs were taken from the uncommon cytological findings; smears of a 6-day old culture were used to determine the percent of cells in the population presenting such features. Cultures of *P. davidi* maintained in our laboratory (LIT medium; around 27°C) were ex-

Fax: +55-21-290.9339

Received 2 September 1996

Accepted 9 December 1996

amined during more than five years, frequently at the first one and more sporadically thereafter. When the same peculiar features reappeared, Giemsa stained-smears were prepared from 3-day old cultures and a quantitative evaluation (%) of morphological types was carried out. In this work all percents were determined by examining about 500 randomly selected forms.

RESULTS

After receipt, during three successive transfers in LIT medium, *P. davidi* cultures presented, as seen in Giemsa-stained smears, besides the typical promastigotes and longitudinally dividing forms, several unusual features, among them being noticeable the pairs of diametrically opposed cells joined by the posterior ends, where occurred a stained line (Figs 1-3, 19, arrowheads) and/or a dilatation, generally bulb-like in shape (Figs 3-6, 15, 17, 18, 19, 26, 27, 30). In pairs presenting the stained line, generally each cell could present its own nucleus (Figs 1, 3, 19), but in some cases one of them had two nuclei (Fig. 2), sometimes close to each other, while the other cell was anucleate. The above-mentioned dilatation sometimes held both cells together (Figs 7-9, 20, 21, 24, arrowhead) or entirely occupied one cell of the pair (Figs 11, 13, 16, 22, 23, 25, 28); sometimes a clearer region was seen in such dilatation (Figs 4, arrowhead, 15, 16, 30). The nuclei of the joined cells sometimes appeared to be entering into the bulb-like dilatation (Fig. 4), but frequently were seen inside or near it (Figs 5, 7, 8, 20, 22). These nuclei could be in close proximity (Figs 5, 7, 8) or apparently fused into a larger one (Figs 6, 9, 11, 21, 23), as well as could display peculiar chromatin arrangements (Figs 17, 18, 24, arrowhead, 29); sometimes one of them seemed to be degenerating (Fig. 30).

In these cultures there were also several mono or binucleate round forms bearing one or two flagella (Figs 10, 12, 14, 24), as well as several slender cells without nucleus, but retaining the kinetoplast and the flagellum (Fig. 12). Throughout this study, an intriguing small stained body was sometimes found near a single nucleus (usually large), either in pairs of apposed parasites (Figs 13, 16, 27, 28, arrows) or in round cells (Fig. 14, arrow). Three or more parasites joined by their posterior ends, and pairs of apposed cells presenting three nuclei (Figs 15, 25) were occasionally observed. Several cells with rounded posterior end or resembling a sucker and presenting one or two nuclei were found as well (Fig. 31). Giemsa-stained smears of a 6-day old culture revealed that 25.1% of the population presented the set of features here described, the pairs being 5.8%.

In fresh preparations, the peculiar forms under

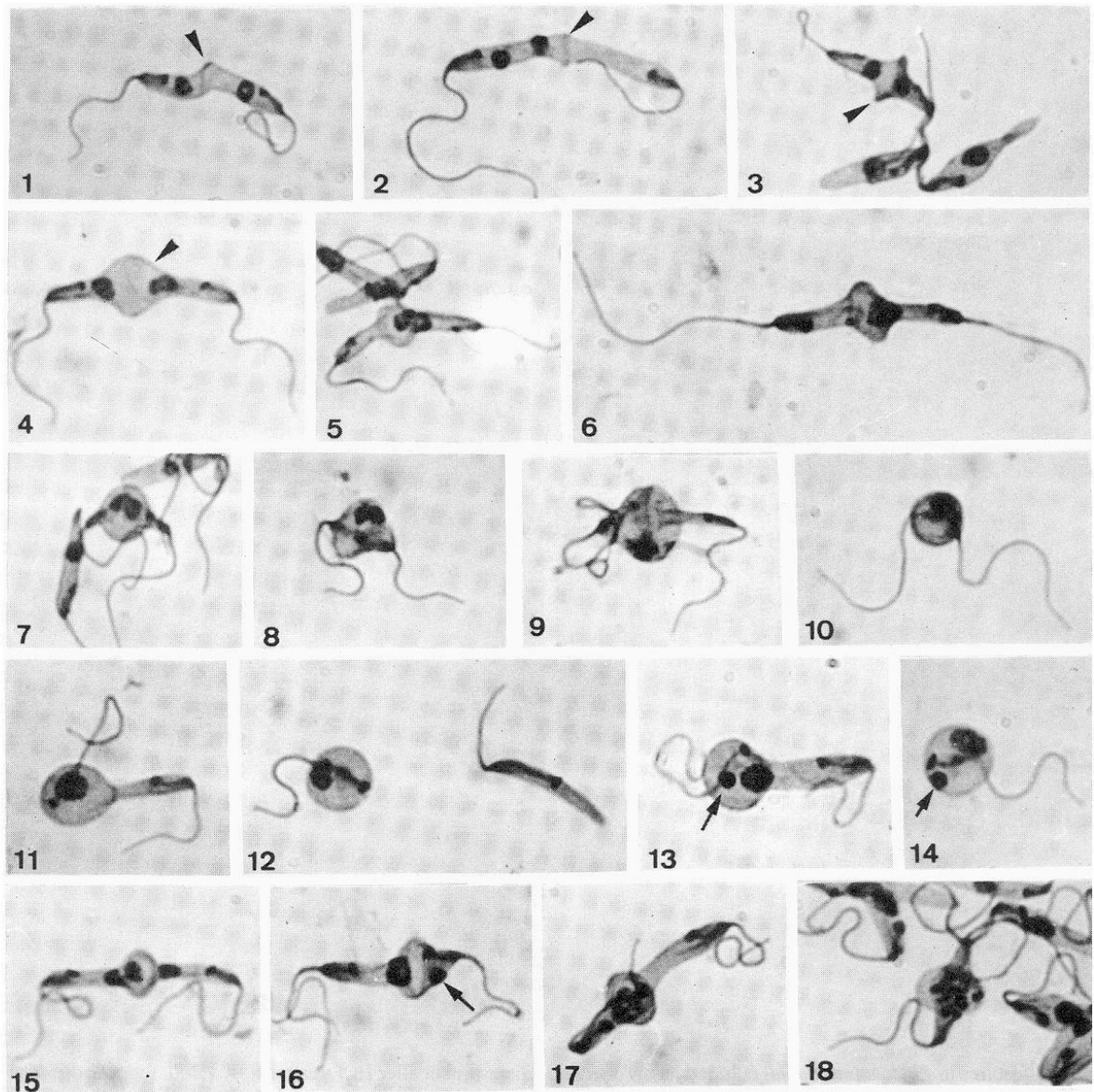
study were also actively moving, being noteworthy the movement of pressure of a cell over the other observed in some parasite pairs presenting a well-developed bulb-like structure; an instantaneous of this movement is shown in Fig. 9.

The above-mentioned phenomenon was not seen in *P. davidi* cultures during more than five years, and without an evident cause reappeared on June 1996. The percents of the morphological types found on this occasion in 3-day old cultures are given in parentheses: pairs of apposed cells without (1.7) or with (5.6) the bulb-like dilatation; mono (7.4) or biflagellate (1.2) round cells; flagellate slender cells without nucleus (2.7); cells with rounded posterior end (4.1); sucker-like cells (2.5); longitudinally dividing cells (2.9); typical promastigotes (70.5); atypical or less frequent forms (1.4).

DISCUSSION

From the descriptions and illustrations presented in this paper, it seems clear that the peculiar pairs of cells found in *P. davidi* cultures have no similarity with longitudinally dividing parasites, furthermore being hardly understood as resulting from another type of division. Typically dividing trypanosomatids generally remain side-to-side and, when they are occasionally seen apposed each other before complete separation, neither a stained line nor any bulb-like structure are found between them, as here reported. However, several pairs of apposed cells described in the present paper resembled the pairs of promastigotes of *Leishmania* formed by fusion (Lanotte & Rioux 1990), which began by contact of posterior ends of two diametrically opposed parasites, their adjacent membranes subsequently disappearing. Thus, the possibility is considered that the peculiar pairs seen in *P. davidi* also had been formed by fusion, the stained line between the cells probably being their contacting membranes at the beginning of the process; as such line was generally absent in pairs presenting the bulb-like dilatation, it is thought that complete fusion ensued.

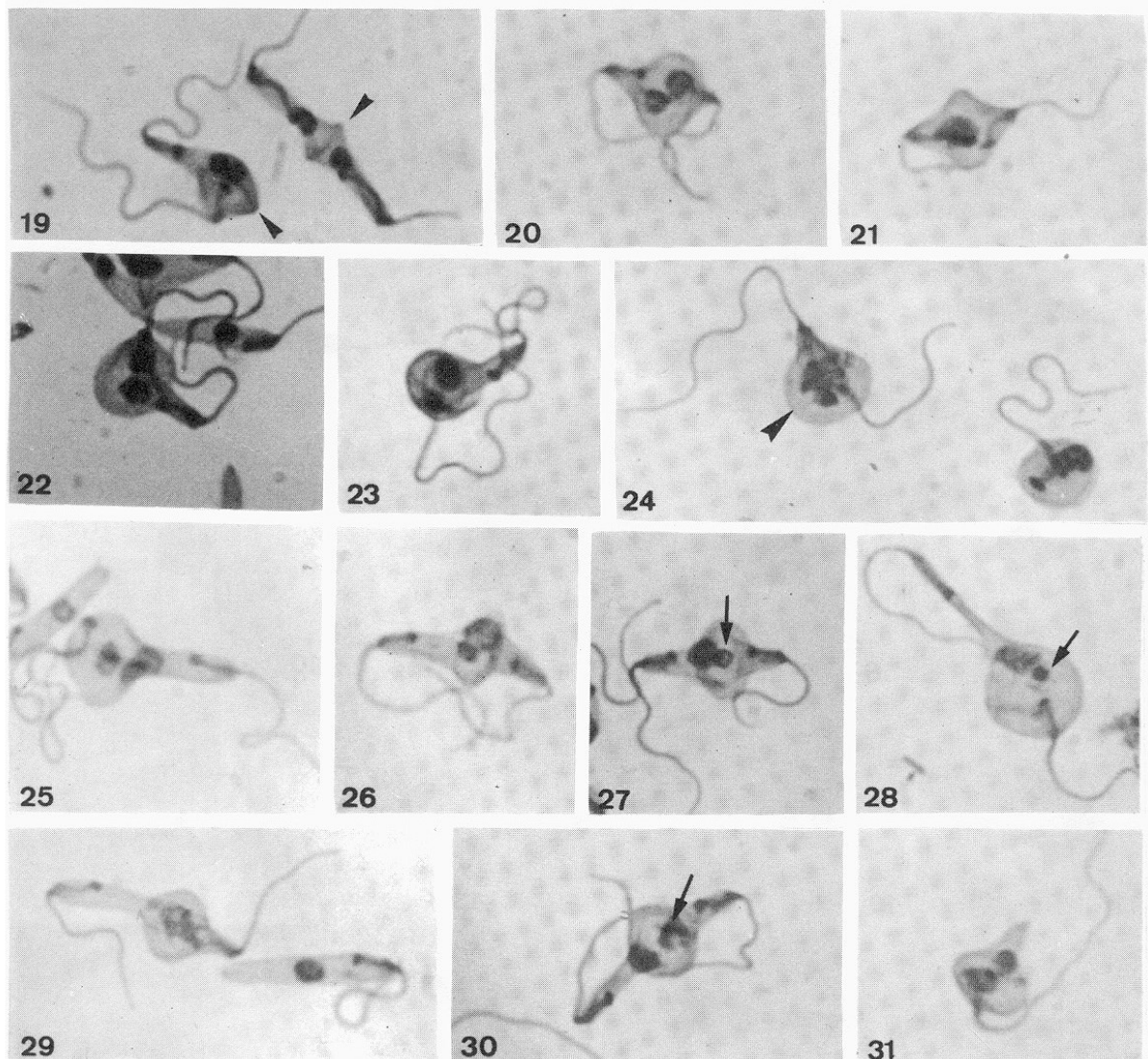
The phenomenon here described also resembled the cell-to-cell interactions found in *L. major* and *H. megaseliae* (Sousa et al. 1993, Sousa 1994) which suggested sexuality, although having two remarkable peculiarities: the presence of the bulb-like structure joining two parasites, and the occurrence of mono or binucleate round cells bearing one or two flagella. On the other hand, no morphological feature of this phenomenon was similar to that one seen in *P. davidi* by França (1920) and questioned whether it was related to a sexual event. Furthermore, the findings reported herein in *P. davidi* also did not seem cellular aberrations (occasionally seen in any culture), mainly



Unusual features in *Phytomonas davidi* cultured in LIT medium. Giemsa stain after HCl treatment. X 1,500. Fig. 1: promastigotes attached by the posterior ends, there occurring a stained line (arrowhead). Fig. 2: apposed cells having both nuclei inside one of them; note the stained line at the cellular junction (arrowhead). Fig. 3: note the enlargement and deep staining at the parasite junction (arrowhead). Fig. 4: bulb-like dilatation between apposed parasites, whose nuclei appear entering into it; note a clearer region there (arrowhead). Fig. 5: close proximity of nuclei in the apposed cells. Fig. 6: pair of parasites apparently with a fused nucleus. Figs 7-8: bulb-like structure holding two parasites, whose nuclei are near each other. Fig. 9: in this pair a pressure movement of a cell over the other is suggested; only one nucleus is seen. Fig. 10: biflagellate round cell apparently with a single nucleus. Fig. 11: bulb-like dilatation occupying one of the parasites, there occurring a large and apparently fused nucleus. Fig. 12: monoflagellate round cell with one nucleus (or two very close) and a slender cell without nucleus. Fig. 13: bulb-like dilatation occupying one of the parasites, where a small stained body (arrow) is seen beside a large nucleus. Fig. 14: monoflagellate round cell with a large nucleus and a small stained body (arrow). Fig. 15: pair of parasites with three nuclei; see the clear halo around one of the nuclei. Fig. 16: apposed cells presenting a dilatation (observe a clearer region there), besides a large nucleus and a small stained body (arrow). Figs 17-18: note the peculiar chromatin arrangement in the bulb-like structure of these pairs.

taking into account that they had a constant pattern of features and were widespread in the cultures on a given occasion, furthermore seeming steps of a sequence.

Although with the data now at hand it was not possible to establish the dynamics of the phenomenon here described, after comparative examination of nearly 350 photomicrographs taken



Unusual features in *Phytomonas davidi* cultured in LIT medium. Giemsa stain after HCl treatment. X 1,700. Fig. 19: different features of attached parasites; note the position of their nuclei, as well as the enlargement and the stained line at the cellular junction (arrowheads). Fig. 20: bulb-like structure holding two parasites, whose nuclei are placed there. Fig. 21: in this pair only one nucleus is seen. Figs 22-23: in these cases the bulb-like dilatation occupies entirely one parasite and almost wholly the other, their nucleus being there. Fig. 24: note the peculiar chromatin arrangement in the bulb-like structure of the joined cells (arrowhead), as well the monoflagellate round cell apparently with two nuclei very close each other. Fig. 25: pair of cells presenting the bulb-like dilatation in one of them and having three nuclei, two of which in close proximity. Fig. 26: this pair presents a large and a small nucleus near each other. Fig. 27-28: note the small stained body (arrow) beside the nucleus in the bulb-like structure, which is very well-developed in the pair shown in figure 28, where also a slim cell appears almost detaching. Fig. 29: the nuclei of the joined cells are not individualized in this pair, whose chromatin appears weakly stained. Fig. 30: in the bulb-like dilatation one of the nuclei seems degenerating. Fig. 31: sucker-like cell with two nuclei.

on Giemsa-stained smears, some sequences of events are tentatively suggested, as follows. The putative fusion of two apposed promastigotes proceeds and at their junction appears a bulb-like dilatation (as in Fig. 4); the nucleus of each cell migrates towards the other, they usually fusing inside or near such dilatation (as suggested in Figs 4-6). In some instances, the bulb-like structure in-

creases holding together both parasites (as in Figs 7-9, 20), thus arising biflagellate round cells with two nuclei or a single large one (as in Fig. 10). In other cases, only one parasite of the pair is occupied by the bulb-like structure, becoming gradually round (as in Figs 11, 13). Subsequently, the cells of such pair are separated releasing monoflagellate round forms with two nuclei or a

single one (sometimes accompanied by a small stained body), besides flagellate slender cells without nucleus (as suggested in Figs 11-14). Although it is not easy to know the fate of the above-cited round cells, it seems that at least some of them can restore its original form (promastigote), as mainly suggested by several sucker-like cells found in the cultures (as in Fig. 31).

A peculiar structure found throughout this study was the small stained body, which sometimes occurred either in pairs of apposed parasites or in round cells, generally near a single large nucleus (Figs 13, 14, 16, 27, 28). Two possibilities have been considered to explain its occurrence: (1) it could be a residual chromatin after a putative fusion of two nuclei; (2) it would be one degenerating nucleus of a pair of joined cells, which previously presented either two or three nuclei. Figs 15 and 16, as well as 25 and 26, suggest that two nuclei can fuse, remaining the third one to degenerate; Fig. 30 suggests one nucleus in degeneration (arrowhead).

Whether the cytological findings reported in this paper can be ascribed to an actual sexuality in *P. davidi*, or simply represent an ancient behavior which is being gradually left off, with no genetic exchange occurring there, at present it is difficult to establish. However, it is noticeable that several of them display opportunities for fusion of two parasites and interactions between nuclei (as in Figs 5-11, 17, 18, 21, 24, 29), thus fulfilling some prerequisites for sex and genetic exchange.

The phenomenon under study was infrequent in *P. davidi* cultures. After its discovery, it gradually disappeared, being seen again only after more than five years. Initially I had considered the possibility of its being triggered by a marked change in the parasite environment following the culture recovery from liquid nitrogen storage, as it was supplied. However, this could not be proved, since such phenomenon did not occur again after defrosting a culture cryopreserved to verify this hypothesis, as well as its reappearance took place in cultures which were not coming from cryopreservation. Thus, further investigation is needed not only to know the reason(s) of the appearance of this phenomenon in *P. davidi*, but also to better understand it by different approaches: at the ultrastructural level, using techniques of molecular genetics to assay the possibility of genetic exchange, as well as trying to dynamically record it.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Wladimir Lobato Paraense for reviewing the manuscript and Dr Monika Barth for allowing the photomicrographs to be taken at her laboratory.

REFERENCES

- Belli AA, Miles MA, Kelly JM 1994. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology* 109: 435-442.
- Camargo EP, Sbravate C, Teixeira MMG, Uliana SRB, Affonso MHT, Floeter-Winter LM 1992. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. *J Parasitol* 78: 40-48.
- Carvalho ALM 1973. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Pat Trop* 2: 223-274.
- Chiari E, Camargo EP 1984. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*, p. 23-26. In CM Morel, *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H 1992. Hybrid parasites in the *Leishmania braziliensis* "complex" causing cutaneous leishmaniasis in humans. *Isozyme Bull* 25: 51.
- Degen R, Pospichal H, Enyaru J, Jenni L 1995. Sexual compatibility among *Trypanosoma brucei* isolates from an epidemic area in southeastern Uganda. *Parasitol Res* 81: 253-257.
- França C 1920. La flagellose des Euphorbes. *Ann Inst Pasteur* 34: 432-435.
- Gibson W, Bailey M 1994. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Mol Biochem Parasitol* 64: 241-252.
- Glassberg J, Miyazaki L, Rifkin MR 1985. Isolation and partial characterization of mutants of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* and their use in detecting genetic recombination. *J Protozool* 32: 118-125.
- Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Le Page RWF, Wells JM, Tait A, Paindavoinc P, Pays E, Steinert M 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322: 173-175.
- Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJJM, Evans DA 1991. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 46: 253-264.
- Lanotte G, Rioux J-A 1990. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *CR Acad Sci Paris* 310 (série III): 285-288.
- LeBlancq SM, Schnur LF, Schlein Y 1983. An apparent association of enzymic variants of *Leishmania major* with specific geographical areas in Brazil. *Bull Soc Path Exot* 76: 543-548.
- Maazoun R, Lanotte G, Rioux J-A, Pasteur N, Killick-Kendrick R, Pratlong F 1981. Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. *Ann Parasitol Hum Comp* 56: 467-475.
- McGhee RB, Postell FJ 1976. Axenic cultivation of *Phytomonas davidi* Lafont (Trypanosomatidae), a symbiote of laticiferous plants (Euphorbiaceae). *J Protozool* 23: 238-241.

170 Cytological Findings in *Phytomonas davidi* • MA Sousa

Sousa MA 1994. Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Res* 80: 112-116.

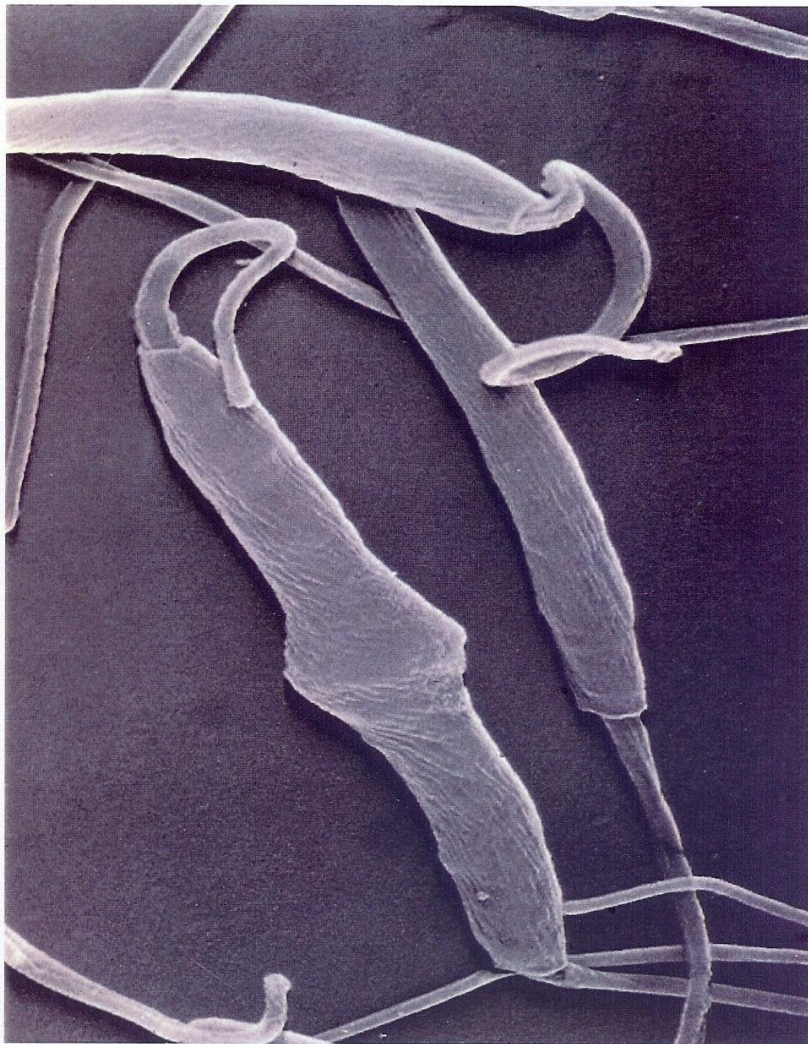
Sousa MA, Côrte-Real S, Pereira MCS, Garcia L 1993. *Leishmania major*: cytological events suggesting sexuality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88

(Suppl): 121.

Tait A, Turner CMR 1990. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* 6: 70-75.

Wallace FG, Roitman I, Camargo EP 1992. Trypanosomatids of plants, p. 55-84. In JP Kreier, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, vol. 2, 2nd ed. Academic Press, New York.

European Journal of PROTISTOLOGY



Editorial Board

H.-D. GÖRTZ
Managing Editor,
Stuttgart, Germany

A. ADOUTTE
Paris, France

P. J. BRUNS
Ithaca, USA

T. CAVALIER-SMITH
Vancouver, Canada

K. HAUSMANN
Berlin, Germany

Y. NOZAWA
Gifu, Japan

M. A. SLEIGH
Southampton, UK

4

Volume 33
December 17, 1997

ISSN 0932-4739
Europ. J. Protistol.
Jena 33(1997)4
pp. 337-460

Europ. J. Protistol. 33, 356–359 (1997)
December 17, 1997

European Journal of
PROTISTOLOGY

Morphological Features Suggesting a Sexual Process in a Trypanosomatid of the Genus *Herpetomonas*

Maria Auxiliadora de Sousa¹, Mirian Claudia de Souza Pereira², Rachel Chebabo³, and Reginaldo Peçanha Brazil⁴

¹Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Protozoologia & ²Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brasil

⁴Laboratório de Leishmaniose, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil

Summary

Morphological features resembling those described in *Herpetomonas megaseliae*, and likewise suggesting a sexual process, were also found in axenic cultures of a *Herpetomonas* sp. isolated from the salivary glands of a phytophagous hemipteran. These features have been frequent over a 3-year period and were quantitatively evaluated during the parasite growth in LIT medium at 27 °C. In Giemsa-stained smears, the more noticeable findings were: (1) pairs of apposed promastigotes joined by the posterior ends, where a ring-like line and/or an enlargement occurs; (2) bell-shaped cells, either free or in pairs with promastigotes; (3) in several pairs, features suggesting nucleus migration and fusion. Indirect immunofluorescence of β -tubulin and scanning electron microscopy suggested cellular fusion in these pairs.

Key words: Trypanosomatid; Morphology; Sexuality; Immunocytochemistry; Scanning electron microscopy.

Introduction

The question whether trypanosomatids have sexual processes has been raised in many occasions and the older literature is rich in descriptions of sexual phenomena which were subsequently denied [6, 22, 23]. Only in the 60's, Deane and Milder [3] recorded the first highly suggestive find of cellular fusion in trypanosomatids, although without evidence of karyogamy. This process was observed in *Trypanosoma conorhini* cultures, giving rise to the so-called "cyst-like bodies".

Renewed interest about trypanosomatid sexuality arose from studies on these organisms at the biochemical and/or molecular levels. These provided data proving genetic exchange in *T. brucei* [4, 7, 20] and suggesting it in some *Leishmania* species [8, 10, 11, 12]. Genetic recombination was also reported between drug resistant mutants of *Crithidia fasciculata* [5]. The first demonstration of fusion in trypanosomatids was given by Lanotte & Rioux [9] on studying axenic cultures of *Leishmania tropica* and *L. infantum* by videocinematography, and other findings suggesting cell and nuclear fusion were subsequently reported for *Phytomonas davidi*, *Herpetomonas megaseliae* and *L. major* as well [15, 16, 18].

In this paper we describe peculiar features frequently found in a *Herpetomonas* sp. [19], which are difficult to interpret in terms of parasite division. They were studied in Giemsa-stained smears, quantitatively evaluated during the parasite growth in culture, and also analyzed by scanning electron microscopy and indirect immunofluorescence for detection of β -tubulin.

Material and Methods

Cultures of the protozoan under study are deposited in the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute under the code number CT-IOC 013. It was isolated from the salivary glands of *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae [1] and further identified as a *Herpetomonas* sp. [19], being different from eight species of this genus, including *H. megaseliae*, as analyzed by pulsed-field gel electrophoresis [17]. This isolate

***Leishmania major*: Parasite Interactions Suggesting Sexuality**

**Maria Auxiliadora de Sousa^{+/}, Mirian Claudia de Souza Pereira*,
Suzana Côrte-Real***

Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Protozoologia *Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*In five experiments, Leishmania (Leishmania) major (MRHO/SU/59/P-strain) grew poorly when seeded in FYTS medium supplemented with 15% fetal calf serum, but presented several peculiar pairs of promastigotes diametrically opposed and attached at their posterior ends (5.8-13.5%). As seen in Giemsa-stained smears, a ring-like line and/or an enlargement, generally occurred at the parasite junction. A close proximity of nuclei, which sometimes were difficult to distinguish from each other, was also observed at this junction. Several of these pairs appeared to be composed of fused cells in which the nuclei could be apparently fused, as shown by fluorescence microscopy to detect β -tubulin and DNA, and by scanning electron microscopy. Under other culture conditions these pairs were absent or occurred at very low rates (0.2-2.2%). Such pairs differ markedly from longitudinally dividing cells and resemble those described in two other *Leishmania* species, as well as in *Herpetomonas megaseliae* and *Phytomonas davidi*, suggesting steps of a putative sexual process.*

Key words: Trypanosomatidae - *Leishmania major* - sexuality - morphology - immunocytochemistry - scanning electron microscopy

The occurrence of sexuality in *Leishmania* has been a subject of interest since the beginning of this century, but several older cytological observations ascribed to sexual events were unconvincing (Rogers 1904, Adie 1921-22, Christophers et al. 1926, Wenyon 1926, Wenrich 1954). This subject was discredited, until Maazoun et al. (1981) reported heterozygous patterns in enzyme electrophoretic variants of three *Leishmania* species, and their paper was followed by several others describing naturally occurring putative hybrids using biochemical and/or molecular methods (Le Blancq et al. 1983, Le Blancq & Peters 1986, Evans et al. 1987, Pagès et al. 1989, Kelly et al. 1991, Cupolillo et al. 1992, Belli et al. 1994, Piarroux et al. 1994, Dujardin et al. 1995). However, genetic recombination between species or strains of *Leishmania* has not yet been demonstrated under laboratory conditions (Gradoni et al. 1986, Evans et al. 1989, Panton et al. 1991, Shehata et al. 1991), although Lanotte and Rioux (1990) had recorded by videocinematography fusion of pairs of apposed promastigotes in cultures of two species, and also evidenced the possibility of nuclear fusion by examining these cultures in Giemsa-stained smears.

In this paper we describe pairs of apposed promastigotes occurring at relatively high percent

in *L. (L.) major* (P strain) when seeded in a medium described for insect trypanosomatids (Roitman et al. 1972), which we had supplemented with fetal calf serum. Such pairs were studied on Giemsa-stained smears, by fluorescence microscopy to examine the β -tubulin distribution and nuclear DNA features, as well as by scanning electron microscopy. The frequency of such pairs under other culture conditions was also examined.

MATERIALS AND METHODS

Promastigotes of a *L. (L.) major* strain (MRHO/SU/59/P) grown in BHI+LIT medium overlaying blood-agar (Jaffe et al. 1984) were seeded in FYTS medium (Roitman et al. 1972) supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum (FYTS+15%FCS), pH 7.0, which was distributed in 4-ml volumes in 16x150 mm screwcap tubes, and kept at about 27°C. Following the finding in fresh preparations of unusual pairs of apposed cells, Giemsa-stained smears were prepared as previously described (Sousa 1994) for morphological studies. Subsequently, two experiments were performed to compare the frequency of such pairs in FYTS+15%FCS with those in LIT medium (Chiari & Camargo 1984), LIT/blood-agar and FYTS+15%FCS/blood-agar. The inoculum was always promastigotes from BHI+LIT/blood-agar cultures, which in the first experiment had no pair of apposed cells, while in the second one presented 0.5%. The cultures were maintained at about 27°C and the percent of pairs of apposed cells was determined daily, from the 2nd to the 7th days, by

⁺Corresponding author. Fax: +55-21-260.4434 or 290.9339

Received 30 December 1996

Accepted 10 July 1997

examining at least 500 cells in fresh preparations. The maximum parasite growth was compared in two culture conditions, FYTS+15%FCS and LIT/blood-agar, in both cases beginning with about 8.5×10^5 cells/ml. The occurrence of pairs of apposed cells in FYTS+15%FCS was also verified by using promastigotes from LIT/blood-agar as inoculum (3 assays).

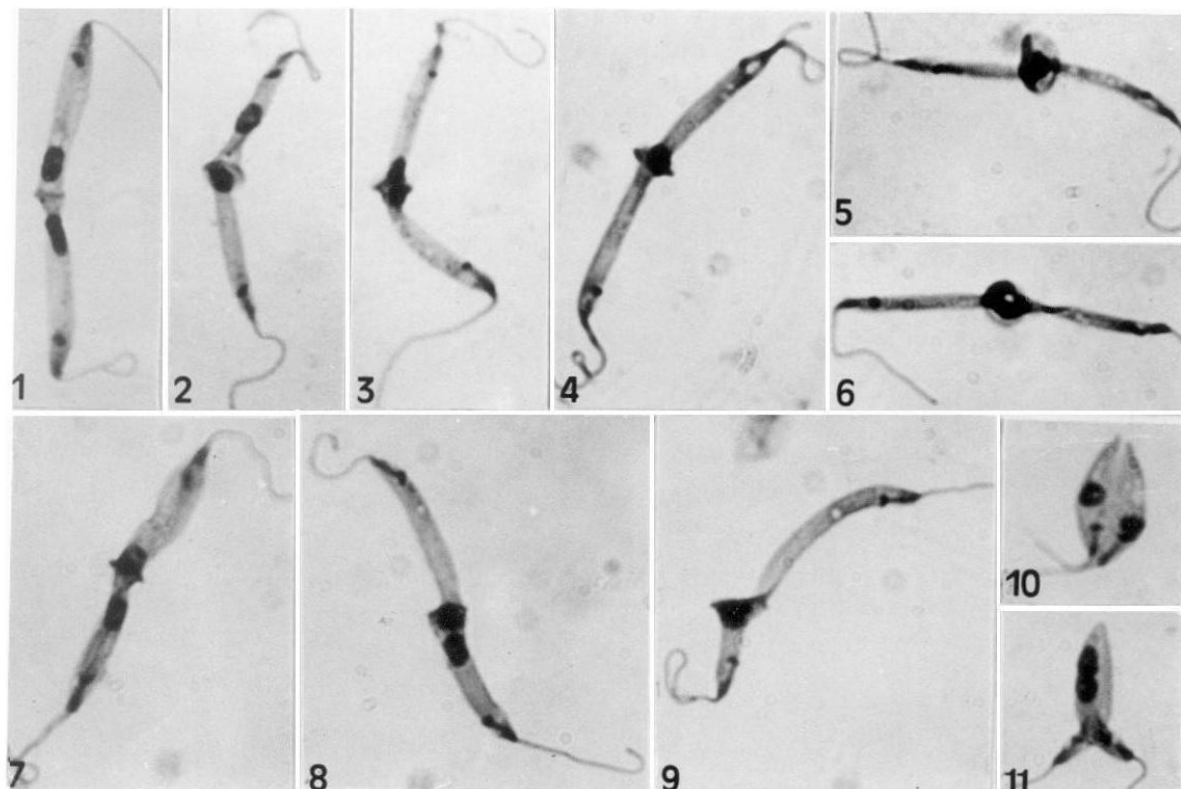
Pairs of apposed cells from a 5-day old culture in FYTS+15%FCS were studied under fluorescence microscopy to examine concomitantly the β -tubulin distribution and the nuclear DNA. Then, the cells were washed in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, allowed to adhere to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips, fixed for 5 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS and rinsed three times in PBS containing 0.5% Triton X-100. Subsequently, the cells were incubated for 1 hr at 37°C with 1:50 anti- β tubulin monoclonal antibody (Sigma), rinsed and incubated for 1 hr with 1:25 fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled rabbit anti-mouse IgG; following a 10 min incubation with 2 mg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma), the coverslips were rinsed in 0.85% NaCl and mounted in 1,4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO; Sigma). The preparations were observed and photographed with

a Zeiss microscope equipped for epifluorescence using selective FITC or DAPI filters.

For scanning electron microscopy, cells from a 5-day old culture in FYTS+15%FCS were adhered to poly-L-lysine coated coverslips as above-described, fixed for 1 hr at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.2, plus 3.5% sucrose, and subsequently washed in this same buffer. After post-fixation in 1% OsO₄ for 30 min, the material was dehydrated in graded series of acetone, dried with CO₂ by the critical-point method, mounted on aluminum stubs and coated with a 20 nm-thick gold layer. The samples were examined with a Carl Zeiss DSM 940 scanning electron microscope.

RESULTS

FYTS+15%FCS medium was unsuitable for growing *L. major* promastigotes, whose population increased somewhat more than twice within 48-72 hr, but thereafter gradually declined. However, such cultures presented a relatively high percent (5.8-13.5%) of peculiar pairs of promastigotes, at times very slender, diametrically opposed to each other and attached at their posterior ends, there generally occurring a ring-like line and/or an enlargement (Figs 1-9) sometimes resembling a hat brim (Fig.



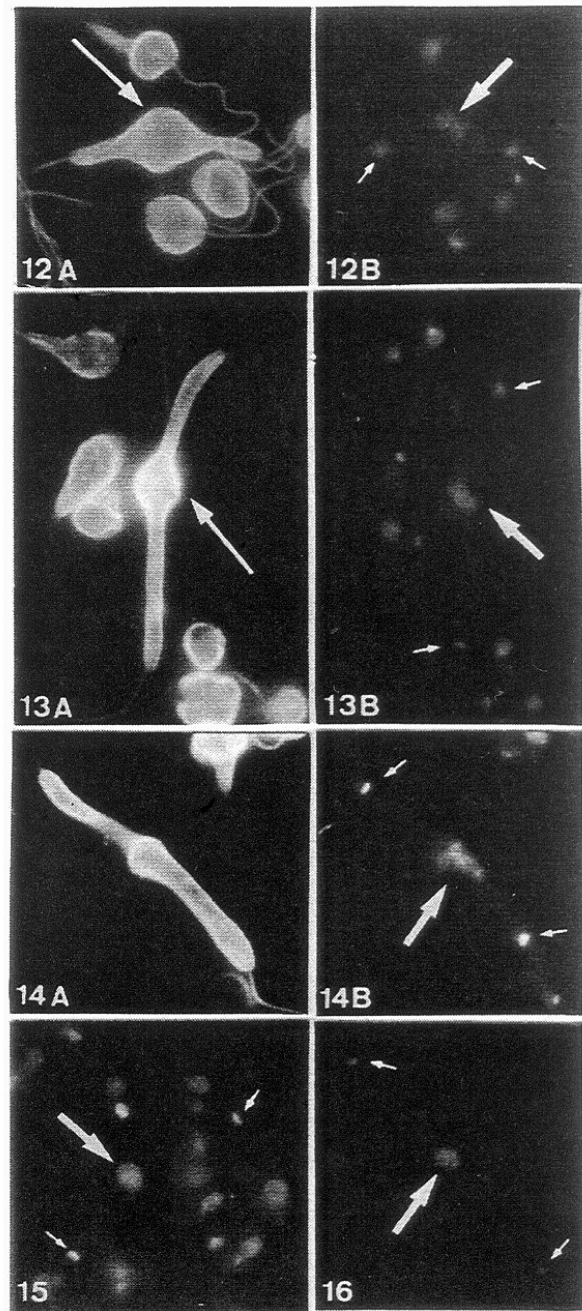
Leishmania major in Roitman's FYTS medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum. Giemsa stain after HCl treatment. X 1,500. Figs 1-9: peculiar pairs of promastigotes suggesting migration and fusion of nuclei; note the ring-like line and/or enlargement at the cell junction, which in Fig. 5 resembles a hat brim. Figs 10-11: longitudinally dividing parasites.

5), as seen in Giemsa-stained smears. In such pairs both nuclei were usually in close proximity and in some instances it was difficult to distinguish one from the other, either in Giemsa-stained slides or under DAPI fluorescence (Figs 3-6, 9, 12B-14B, 15, 16). Several pairs seemed composed of fused cells, as suggested either by indirect immunofluorescence of β -tubulin (Figs 12A, 13A, arrows) or by scanning electron microscopy, which also evidenced the peculiar enlargement and meeting of nuclei at the level of the parasite junction (Figs 17-21). Typically dividing cells could also be seen in FYTS+15%FCS (Figs 10, 11).

In fresh preparations, the pairs under study were actively moving and presented an uncommon brightness at the level of nucleus. The phenomenon of formation of these pairs in FYTS+15%FCS medium was reproducible in 5/5 assays, the inoculum being promastigotes either from BHI+LIT/blood-agar or LIT/blood-agar. The percent of these pairs in different culture conditions are given in Table. *L. major* grew luxuriantly in LIT/blood-agar and to a lesser extent in other media (FYTS+15%FCS/blood-agar > LIT > FYTS+15%FCS). Beginning with about 8.5×10^5 promastigotes/ml, the maximum growth in LIT/blood-agar was nearly 6×10^7 cells/ml (5th day), whereas in FYTS+15%FCS it was around 2×10^6 cells/ml (2nd day).

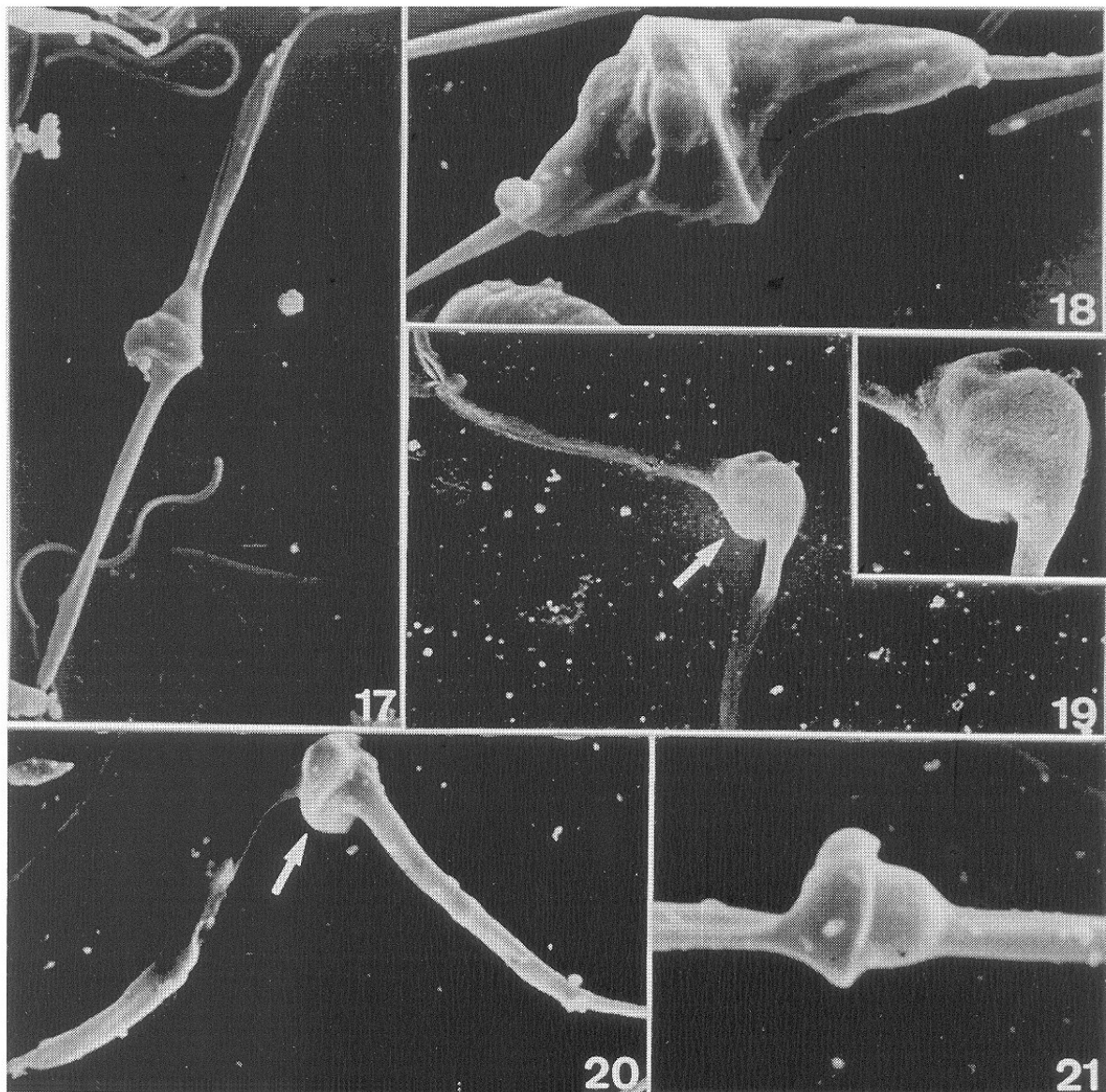
DISCUSSION

To our knowledge, in *Leishmania* species, pairs of promastigotes such as these described herein have not been reported previously. They also differ from those found in another *L. major* strain during experimental infection in *Lutzomyia longipalpis* (Walters et al. 1993), which were apposed paramastigotes. These pairs also markedly differ from cells joined laterally during longitudinal binary fission (compare Figs 1-9 with 10 and 11). It is worthy mentioning that although dividing trypanosomatids can occasionally be attached by their posterior ends before complete separation, they neither present any enlargement nor the proximity of nuclei at the level of their junction, as commonly seen here. However, the pairs of promastigotes described by us are somewhat similar to those reported in *Herpetomonas megaseliae* and *Phytomonas davidi* (Sousa 1991, 1994), and resemble those formed by fusion previously described in *L. infantum* and *L. tropica* (Lanotte & Rioux 1990), since the parasite attachment occurs by the posterior ends, the cells remaining apposed to each other, and on several occasions nuclear fusion appears to take place. Our studies to detect both β -tubulin and DNA in such pairs, as well as our findings by scanning electron microscopy,



Leishmania major in Roitman's FYTS medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum. Fluorescence microscopy of doubly labeled cells to detect β -tubulin and DNA. X 1,500. Figs 12A-14A: indirect immunofluorescence of tubulin in pairs of apposed cells showing no discontinuity at their junction in Figs 12A and 13A (arrows). Figs 12B-14B, 15-16: DAPI fluorescence of kinetoplast (short arrow) and nucleus (large arrow) in pairs of apposed cells; note the very close proximity of nuclei, mainly in Figs 15 and 16.

strongly suggest cellular fusion in the majority of cases, as well as close contact or even fusion of the nuclei (Figs 12A-21). Taking together our findings and those from the literature, we have considered the possibility that a fusion process to pro-



Leishmania major in Roitman's FYTS medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum. Scanning electron microscopy. Fig. 17: pair of very slender cells, diametrically opposed to each other, and presenting the nuclei at the level of their junction (X 3,100). Fig. 18: this pair illustrates the possibility of cellular fusion (X 7,000). Fig. 19: pair of very slender cells fused at their posterior ends, there occurring close contact of nuclei, arrow (X 3,340; X 6,500). Fig. 20: note the peculiar hat brim-like enlargement (arrow) at the parasite junction (X 3,600). Fig. 21: nuclear meeting at the cellular junction (X 6,750).

mote nuclear interactions could have generated the pairs here described, this strongly suggesting a sexual process. Our data confirm that in trypanosomatids phenomena can occur in which the cytological bases for genetic recombination are clearly present.

The finding of putative hybrids of other *L. major* isolates (Le Blancq et al. 1983) and of *L. major/L. arabica* (Evans et al. 1987, Kelly et al. 1991) support the hypothesis of occurrence of genetic exchange in these species, although it has been considered infrequent (Le Blancq et al. 1983, Kelly et al. 1991). In the present study, we verified

that the pairs of apposed promastigotes suggesting a sexual process were not common in media other than FYTS+15%FCS, they usually not being found or occurring in low numbers. It is accepted that genetic recombination mediated by sex is generally a major mechanism promoting diversity within a species, consequently enhancing its chances of survival in a fluctuating environment. As our paper shows close association between two cells and their nuclei, the question arises whether the unsuitable conditions for *L. major* growth in supplemented FYTS medium could have triggered the formation of such pairs to propitiate some type of

TABLE
Percent of pairs of apposed promastigotes in *Leishmania major* under different culture conditions; parasites from BHI+LIT/blood-agar were used as inoculum

Days	FYTS+15%FCS		LIT	LIT/blood-agar		FYTS+15%FCS/ blood agar
	(1)	(2)		(1)	(2)	
2	13.0	7.3	0	0.3	0	0.7
3	11.5	13.5	2.0	0.9	0	1.2
4	7.7	5.8	0.3	1.4	0	1.1
5	8.5	5.7	2.2	0.2	0.2	0.9
6	7.8	5.8	0.8	0.6	0	0.8
7	5.8	6.3	0	0.2	0	1.4

(1) and (2), respectively, the 1st and 2nd experiments.

BHI: brain heart infusion medium; LIT: liver infusion-tryptose medium; FYTS+15%FCS: folic acid-yeast extract-tryptose-sucrose medium supplemented with 15% fetal calf serum.

genetic exchange. There is much to be done on this subject and studies are planned to explain better the present findings, such as determining the biochemical and molecular structure of this organism, both before and after being cultured in supplemented FYTS.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Wladimir Lobato Paraense for reviewing the manuscript, Miss Sheila Medeiros dos Santos for technical assistance and Dr Monika Barth for allowing several photomicrographs to be taken at her laboratory.

REFERENCES

- Adie HA 1921-22. Preliminary note on the development of the Leishman donovan parasite in spleen juice and in the alimentary tract of *Cimex lectularius* (Lin.). *Indian J Med Res* 9: 255-260.
- Belli AA, Miles MA, Kelly JM 1994. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology* 109: 435-442.
- Chiari E, Camargo EP 1984. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*, p. 23-26. In CM Morel, *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Christophers SR, Shortt HE, Barraud PJ 1926. The morphology and life cycle of the parasite of Indian kala-azar in culture. *Indian Med Res Mem* 4: 19-53.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H 1992. Hybrid parasites in the *Leishmania braziliensis* "complex" causing cutaneous leishmaniasis in humans. *Isozyme Bull* 25: 51.
- Dujardin J-C, Bañuls A-L, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Le Ray D, Arevalo J, Tibayrenc M 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica* 59: 293-307.
- Evans DA, Kennedy WPK, Elbihari S, Chapman CJ, Smith V, Peters W 1987. Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia* 29: 165-173.
- Evans DA, Smith V, Killick-Kendrick R, Neal RA, Peters W 1989. Evidence for hybrid formation in the genus *Leishmania*, p. 685-690. In DT Hart, *Leishmaniasis: the current status and new strategies for control*, Plenum Press, New York, London.
- Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Pozio E 1986. Infestations mixtes de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par différents zymodèmes du complexe *Leishmania infantum*. Etude expérimentale, p. 305-310. In J-A Rioux, *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEEE, Montpellier.
- Jaffe CL, Grimaldi G, McMahon-Pratt D 1984. The cultivation and cloning of *Leishmania*, p. 47-91. In CM Morel, *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJJM, Evans DA 1991. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 46: 253-264.
- Lanotte G, Rioux J-A 1990. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C R Acad Sci Paris* 310 (série III): 285-288.
- Le Blancq SM, Peters W 1986. *Leishmania* in the Old World: 2. Heterogeneity among *L. tropica* zymodemes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 113-119.
- Le Blancq SM, Schnur LF, Schlein Y 1983. An apparent association of enzymic variants of *Leishmania major* with specific geographical areas in Israel. *Bull Soc Path Exot* 76: 543-548.
- Maazoun R, Lanotte G, Rioux J-A, Pasteur N, Killick-Kendrick R, Pratlong F 1981. Signification du polymorphisme enzymatique chez les Leishmanies. *Ann Parasitol Hum Comp* 56: 467-475.
- Pagès M, Bastien P, Veas F, Rossi V, Bellis M, Wincker P, Rioux J-A, Roizès G 1989. Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol Biochem Parasitol* 36: 161-168.
- Panton LJ, Tesh RB, Nadeau KC, Beverley SM 1991. A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J Protozool* 38: 224-228.
- Piarroux R, Trouvé V, Pratlong F, Martini A., Lambert

- M, Rioux JA 1994. The use of isoelectric focusing on polyacrilamide gel for enzymatic analysis of "Old World" *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 475-478.
- Rogers L 1904. On the development of flagellated organism (trypanosomes) from the spleen protozoic parasites of cachexial fevers and kala-azar. *Q J Microsc Sci* 48: 367-377.
- Roitman C, Roitman I, Azevedo HP 1972. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in a defined medium. *J Protozool* 19: 346-349.
- Shehata M, El Sattar S, Morsy T, El Sawaf B 1991. Experimental dual infection of *Leishmania* in *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 739-740.
- Sousa MA 1991. Cytological events suggesting sexuality in a trypanosomatid. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 (Suppl 1): 268.
- Sousa MA 1994. Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol Res* 80: 112-116.
- Walters LL, Irons KP, Chaplin G, Tesh RB 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 30: 699-718.
- Wenrich DH 1954. Sex in Protozoa. A comparative review, p. 134-265. In DH Wenrich, IF Lewis, JR Raper (eds), *Sex in Microorganisms*, American Association for Advancement of Science, Washington.
- Wenyon CM 1926. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarian and Zoologists*, vol I, p. 336-340, Bailliére, Tindall and Cox, London.

Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its Distinction from other Trypanosomes

Maria Auxiliadora de Sousa

Coleção de Trypanosomatídeos, Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Key words: *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* - *Trypanosoma conorhini* - *Trypanosoma lewisi* - *Trypanosoma minasense* - *Trypanosoma freitasi* - Chagas disease - morphobiology - characterization

The etiologic agent of the human American trypanosomiasis was discovered by Chagas (1909a) initially in triatomine bugs, *Panstrongylus megistus*, collected in Lassance, State of Minas Gerais, Brazil. Its infectivity to some laboratory animals was soon confirmed, a peculiar small trypanosome appearing in the blood of these animals, which Chagas (1909a) named *Trypanosoma cruzi* in honor of Oswaldo Cruz. The first natural infection of a mammal with *T. cruzi* was recorded in a cat also by Chagas (1909b), who subsequently found the parasite in the blood of a child, and associated to it the illness found in that child, as well as in other persons living in houses infested with triatomine bugs in Lassance. At that time, Chagas (1909b) also carried out studies on this parasite in human beings, experimental mammal hosts, triatomines and axenic cultures. Believing that *T. cruzi* presented schizogonic stages in the lungs of vertebrate hosts, Chagas (1909b) temporarily placed it in a new genus, *Schizotrypanum*, but subsequently corrected such mistake (Chagas 1913). Chagas (1912, 1924) also found *T. cruzi* in wild animals, armadillos (incriminating *P. geniculatus* as its vector) and squirrel monkeys. The evolution of *T. cruzi* in *Triatoma infestans* and the possibility of this species and *T. sordida* acting as vectors were also reported by Chagas (1912).

Hartmann (1910) and Vianna (1911) discovered the intracellular multiplication of *T. cruzi*, but the latter correctly interpreted it as occurring by binary fission. Vianna (1911) carried out an extensive histopathological study in *post-mortem* patients and experimental animals, evidencing the parasite multiplication in several tissues, mainly myocardium and skeletal muscles. Brumpt (1912) studied the development of *T. cruzi* in *P. megistus*,

cimicids and ticks, discovering the infectivity to mammals of the trypomastigotes found in the posterior intestine and in the feces (metacyclics). An important revision of *T. cruzi* biology was undertaken by Dias (1934), being noteworthy his detailed study on the parasite development in triatomines. The name *Schizotrypanum* as subgenus, *T. (S.) cruzi* being the type species, became largely accepted after Hoare's reviews on mammal trypanosomes (1964, 1972). More recently, an interesting aspect of *T. cruzi* biology was described by Deane et al. (1984), who discovered stages typically found in triatomines also in the lumen of anal glands of the opossum *Didelphis marsupialis*.

The intraspecific variability of *T. cruzi* was early known and can be easily verified by morphobiological approaches. Such variability is not surprising for a parasite having so wide geographic distribution in the American Continent and so great diversity of hosts, which can actuate as biological filters on its natural populations. It is worthy mentioning that more than 200 species/subspecies of mammals and more than 70 species of triatomines have been reported as *T. cruzi* hosts (Deane 1961, 1964, Barreto & Ribeiro 1979, Sherlock et al. 1997). Some authors have provided evidences that genetic exchange may also contribute to diversity in *T. cruzi* (Bogliolo et al. 1996, Carrasco et al. 1996). However, despite its great variability, it has been largely accepted that *T. cruzi* can be identified by a set of features, which have been summarized also by Barreto and Ribeiro (1979): (1) infectivity to common laboratory mammals, mainly young mice, rats and guinea-pigs, being this verified either directly by blood examination or indirectly by hemoculture and xenodiagnosis; (2) small size and peculiar morphological features of the bloodstream trypomastigotes, the more remarkable one being the large round kinetoplast (Fig. 1: A-C); (3) infectivity to triatomines, in their mid- and hindgut mainly occurring as epimastigotes, and in the latter also as peculiar slim metacyclic trypomastigotes (17-22 μ m in length, according to Hoare 1972) which have a large round subter-

Fax: +55-21-290.9339 or 598.4320

E-mail: masousa@gene.dbbm.fiocruz.br

Received 9 June 1999

Accepted 9 August 1999

minal kinetoplast (Fig. 2: H6, 7); (4) easy growth at about 27°C in several conventional culture media (NNN, LIT, Warren, and so on), presenting stages similar to those found in triatomines (Fig. 2: H); (5) capacity for intracellular multiplication as amastigotes, either in mammal host tissues or cellular cultures, subsequently originating trypomastigotes similar to the blood forms.

Aiming to confirm whether new isolates are or not *T. cruzi*, several authors have also used or suggested the use of "protection assays" (Dias 1935, Barreto & Ribeiro 1979, Marinkelle 1982, Steindel et al. 1998). Otherwise, as the epimastigotes of *T. cruzi*, either from insect gut or axenic cultures, are susceptible to complement lysis (Muniz & Borriello 1945), this test can be additionally used for its characterization. Isolates (from mammals or triatomines) which have features of the subgenus *Schizotrypanum*, while partially characterized, have been usually identified as *T. cruzi*-like organisms. The validity of those species proposed to some *T. cruzi*-like trypanosomes found in non-human primates (*T. prowazeki*, *T. lesourdi*, *T. sanmartini*) is matter of discussion, they not being largely accepted (Deane 1964, Hoare 1972, Marinkelle 1976b).

The occurrence of *T. cruzi*-like organisms in American bats is a problem to be considered in epidemiological studies on the agent of Chagas disease. Whereas being largely accepted that *T. cruzi* occurs in bats as well (Clark & Dunn 1932, Deane 1961, 1964, Hoare 1972, Marinkelle 1976a, 1982, Barreto & Ribeiro 1979), new *T.* (*Schizotrypanum*) species/subspecies were proposed to several isolates from chiropterans mainly based on their apparent lack of infectivity to common laboratory animals and/or triatomines, as well as on morphological peculiarities (reviewed by Dias 1935, Hoare 1972, Marinkelle 1976a, Molyneux 1991). However, the state of our knowledge about these organisms is yet unsatisfactory and comparative studies using well-characterized *T. cruzi* strains are necessary to better establish their distinction. Otherwise, the actual host-restriction of some *Schizotrypanum* species from bats should be confirmed, at least by examining for periods longer than 60 days those hemocultures from experimentally inoculated laboratory animals.

According to Hoare (1972), the mean total length of the bloodstream trypomastigotes in several *T. cruzi* isolates, either from natural or experimental hosts, ranged from 16.3 to 21.8 µm. The morphological variability of these trypomastigotes was early noted by Chagas (1909b), who described the slender (Fig. 1: A1, B3, C1) and broad (Fig. 1: A2, B1, C3) forms. However, other types, as short (Fig. 1: B2), very broad (Fig. 1: C4, 5) and inter-

mediate forms (Fig. 1: A3, C2) can also be found (Silva 1959, Brener & Chiari 1963). The rate of these forms varies according to the parasite strain, the phase of infection, as well as the host species (Silva 1959, Brener 1965, Andrade 1974, Sogayar 1978, Urdaneta-Morales 1983). Brener (1965) and Andrade (1974) grouped some *T. cruzi* strains according to the predominance of each form and their behavior in experimentally infected mice, mainly considering the pattern of parasitemia, predominant lesions or tissue parasitism, virulence and lethality. However, those groupings can not be correlated to each other at all; for example, those strains predominantly presenting stout forms, producing increasing parasitemia and high mortality in mice (Brener 1965, Carneiro et al. 1991) do not fit in with the strain types (biodesmes) proposed by

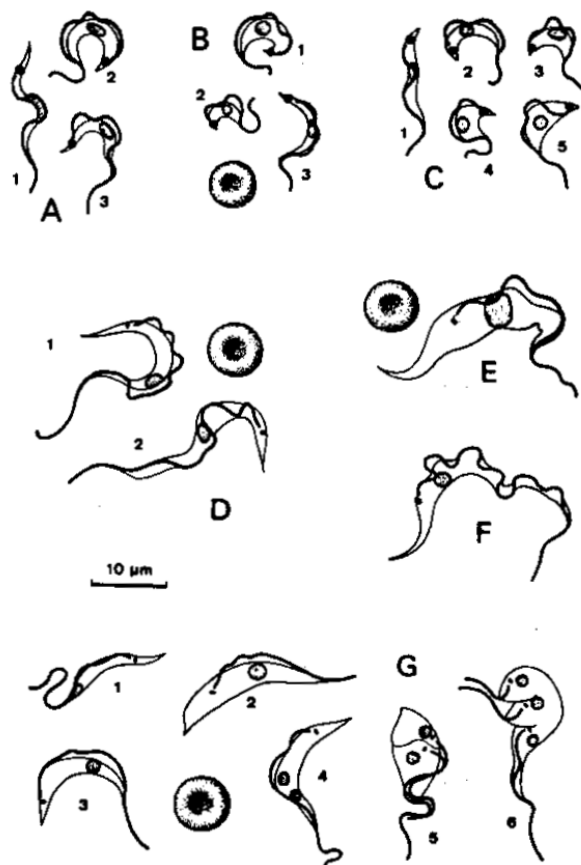


Fig. 1 - A, B, and C: *Trypanosoma cruzi*, Y, FL and CL strains, respectively, forms from the blood of experimentally infected mice. D: *T. rangeli*; 1: bloodstream trypomastigotes from naturally infected *Saimiri ustus*; 2: blood forms from experimentally infected *Callithrix jacchus*. E: *T. minasense*, bloodstream stage from naturally infected *C. penicillata*. F: *T. conorhini*, bloodstream type trypomastigote from the supernatant of parasite co-culture with L929 cell line at 37°C. G: *T. lewisi*, stages from the blood of experimentally infected rat; 5-6 are dividing epimastigotes. Red blood cells from mouse, squirrel monkey, marmoset and rat are shown for comparison in B, D, E and G, respectively. Camera lucida drawings from Giemsa-stained smears.

Andrade (1974). Otherwise, *T. cruzi* strains determining only subpatent parasitemia in mice can not be considered according to those parameters.

Some studies have suggested that the different *T. cruzi* blood forms may have also different biological roles and that, at least partially, the features of a strain may depend on the predominance of one of them (Brenner 1965, 1969). Several authors provided evidences that the slender forms would be more fitted for cellular invasion, whereas the broad ones would more promptly develop in triatomines or axenic cultures (Silva 1959, Brenner 1969, Howells & Chiari 1975, Deane 1979, Sousa et al. 1982, Schmatz et al. 1983). However, Deane (1979) emphasized the possible occurrence of undifferentiated or ambivalent bloodstream trypomastigotes, perhaps represented by the so-called intermediate forms, which would develop either inside cells or in axenic cultures. Brenner and Chiari (1965) also reported that the pattern of early growth in culture (or citrated blood) at 28°C of different *T. cruzi* strains varied according to their predominant blood form.

Since *T. cruzi* has a notable range of hosts, it is not infrequent that these can be parasitized by other trypanosomes, and that mixed infections can occur when their geographic distribution overlaps. It is frequently possible to distinguish these trypanosomes from *T. cruzi* by classical morphobiological approaches, and herein some of them are reported with emphasis on useful features to their differential diagnosis. Aiming at a more complete characterization of these trypanosomes or knowledge of other species some important reviews (Hoare 1972, D'Alessandro 1976, Marinkelle 1976a, b, Molyneux 1976, 1991, Wells 1976, D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992) and original papers should be consulted. It is worthy mentioning that those morphobiological approaches are not in opposition to the use of biochemical and molecular techniques to characterize and identify these trypanosomes, but rather they greatly contribute for a more wide and comprehensive view of their evolution and taxonomy.

T. rangeli Tejera, 1920 is a non-pathogenic trypanosome of human beings and several mammals transmitted through inoculative route by some triatomine species (mainly genus *Rhodnius*), and frequently shares hosts with *T. cruzi* (Hoare 1972, D'Alessandro 1976, D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992). Although the natural or experimental mammal hosts of *T. rangeli* (or *T. rangeli*-like parasites) usually display low or subpatent parasitemia, its bloodstream trypomastigotes can be distinguished from those of *T. cruzi* mainly by their larger size and smaller kinetoplast (Fig. 1: D1, 2). According to D'Alessandro (1976) the mean total

length of *T. rangeli* blood forms from various reports ranged from 26.4 to 33.8 µm. No multiplication site of this parasite in mammals has been convincingly demonstrated (D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992). In triatomine bugs, *T. rangeli* develops in the intestine, but unlike *T. cruzi*, can invade the hemocele, as well as the salivary glands, where large number of metacyclics are formed. These are small and broad trypomastigotes, 8-13 µm in length (D'Alessandro 1976), with an inconspicuous undulating membrane, a subterminal and a relatively large kinetoplast (Fig. 2: J11). *T. rangeli* can also be cultivated in conventional liquid media usually overlaying blood-agar slants, but it is more exigent than *T. cruzi* to be maintained by serial transfers. Either in triatomines or in recently isolated cultures (at about 27°C), *T. rangeli* can be very polymorphic, presenting small epimastigotes or aflagellate forms (Fig. 2: J1, 2), medium-sized epi- or trypomastigotes (Fig. 2: J5-7), peculiar long epi- and trypomastigotes (which may reach 100 µm or more, according to D'Alessandro, 1976) (Fig. 2: J3, 4, 8), besides metacyclic trypomastigotes (Fig. 2: J9-11). Several *T. rangeli*-like trypanosomes were described as separate species (*T. diasi*, *T. mycetae*, *T. myrmecophagae*, *T. saimirii*, and so on), but their taxonomic status has been discussed by several authors (Deane & Damasceno 1961, Hoare 1972, D'Alessandro 1976, D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992, Ziccardi & Lourenço-de-Oliveira 1998).

T. (Herpetosoma) lewisi (Kent 1880) is a common parasite of rats in various parts of the world (*Rattus rattus*, *R. norvegicus* and others), being transmitted by fleas; it is normally host-restricted, confined to rats, and non-pathogenic (Hoare 1972, Molyneux 1976). Its bloodstream trypomastigotes are very distinct from those of *T. cruzi*, usually having the nucleus anteriorly placed, the small rod-like kinetoplast and the poorly-developed membrane undulating (Fig. 1: G1-3). During its reproductive phase, *T. lewisi* multiplies in the blood (as epimastigotes) mainly by successive unequal divisions (Fig. 1: G5, 6). Following this phase only monomorphic trypomastigotes ("adults") remain in the blood; their mean total length is 30.6 µm (Hoare 1972). *T. lewisi* does not develop in triatomines, but can growth in axenic cultures at about 27°C (Hoare 1972, Molyneux 1976). There are several *T. lewisi*-like trypanosomes described under other specific names (*T. forattinii*, *T. coutinhoi*, and so on) and which were only partially studied (Deane 1961, Hoare 1972).

T. (Megatrypanum) conorhini (Donovan, 1909) is another common parasite of rats (*R. rattus*) and possibly of non-human primates, being transmitted by *Triatoma rubrofasciata*; it is easily culti-

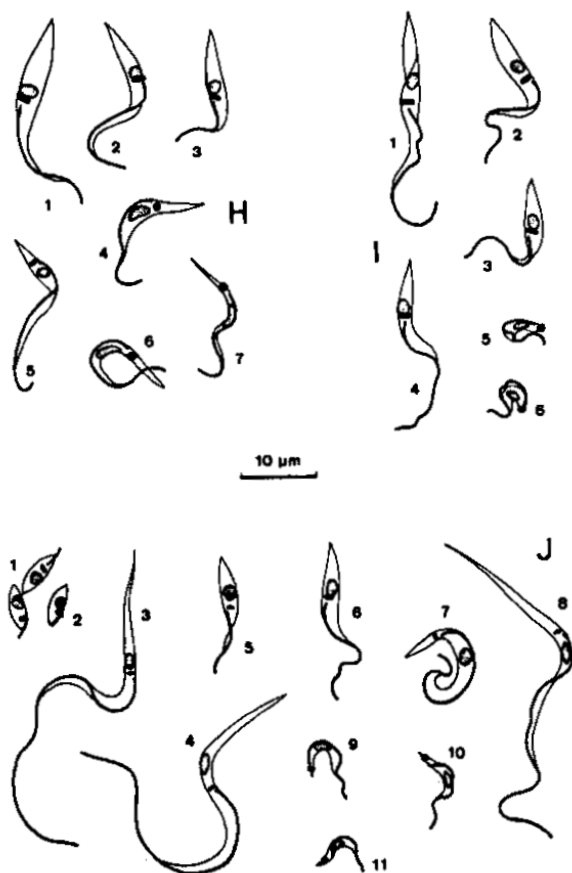


Fig. 2- H: *Trypanosoma cruzi*, CL strain in axenic culture; 1-3: epimastigotes; 4-5: transitional trypomastigotes; 6-7: metacyclics. I: *T. conorhini*, Lourenço-de-Oliveira/Ziccardi strain in axenic culture; 1-4: epimastigotes; 5: transitional stage to metacyclic; 6: metacyclic. J: *T. rangeli*, SC 58 strain; 1-10 stages from a recently isolated culture; 1: small epimastigotes; 2: small aflagellate form; 3-6: epimastigotes; 7-8: trypomastigotes; 9-10: metacyclic-like trypomastigotes; 11: metacyclic from salivary glands of experimentally infected *Rhodnius prolixus*. Camera lucida drawings. All cultures were maintained at about 27°C. Giemsa-stained smears after HCl digestion.

vated and can experimentally infect some laboratory animals and other triatomine species (Dias & Seabra 1943, Deane 1947, Deane & Deane 1961, Hoare 1972, Deane et al. 1986). Parasitemia in natural or experimental hosts is usually scanty or subpatent. *T. conorhini* bloodstream forms are large trypanosomes, 36-62 µm in total length, which have a medium-sized kinetoplast usually far from its pointed posterior end, and a well-developed undulating membrane (Fig. 1: F) (Hoare 1972). In axenic cultures at nearly 27°C, as in triatomines, besides epimastigotes, peculiar metacyclic trypomastigotes can be found (Fig. 2: I). These metacyclics are usually very short and stumpy forms (average <10 µm, according to Deane & Deane 1961), having an inconspicuous undulating membrane and a large ter-

minal kinetoplast (Fig. 2: I6); they seem to arise from spheromastigotes by an unrolling process (Fig. 2: I5).

Other species belonging to the *Megatrypanum* subgenus, as *T. minasense* (Fig. 1: E) from non-human primates, *T. freitasi* from opossums, *T. leonidasdeanei* and *T. pessoai* from bats, are also easily distinguished from *T. cruzi* by their large bloodstream forms, non-infectivity for mice, hard or no growth in triatomines and in conventional culture media (Deane & Damasceno 1961, Hoare 1972, Marinkelle 1976a, b, Molyneux 1991, Ziccardi et al. 1996). However, *T. freitasi* can also be found in the lumen of anal glands of opossums (Deane & Jansen 1990).

ACKNOWLEDGMENTS

To Profs Dayse CB Branco and Glória MC Gonçalves for helping in the illustrations. To Drs Mario Steindel, Mariangela Ziccardi, Neide Thomaz for providing some materials used in the illustrations. To Dr Wladimir Lobato Paraense for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Andrade SG 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Pat Trop* 3: 65-121.
- Barreto MP, Ribeiro RD 1979. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909. *Rev Inst Adolfo Lutz* 39: 25-36.
- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop* 61: 31-40.
- Brener Z 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 59: 19-26.
- Brener Z 1969. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol* 63: 215-220.
- Brener Z, Chiari E 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 220-224.
- Brener Z, Chiari E 1965. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J Parasitol* 51: 922-926.
- Brumpt E 1912. Le *Trypanosoma Cruzii* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex Boueti* et *Onithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull Soc Pathol Exot* 5: 360-367.
- Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E 1991. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 387-393.
- Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Amer J Trop Med Hyg* 54: 418-424.
- Chagas C 1909a. Neue Trypanosomen. *Arch Schiffs Tropenhyg* 13: 120-122.

- Chagas C 1909b. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 11-80.
- Chagas C 1912. Sobre um trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma Cruzi* no mundo exterior. *Brazil-Med* 1: 305-306.
- Chagas C 1913. Revisão do ciclo evolutivo do "*Trypanosoma Cruzi*". *Brazil-Med* 27: 225.
- Chagas C 1924. Sobre a verificação do "*Trypanosoma cruzi*" em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). *Scien Med* 2: 75-76.
- Clark HC, Dunn LH 1932. Experimental studies on Chagas disease in Panama. *Am J Trop Med* 12: 49-77.
- D'Alessandro A 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, p. 327-403. In WHR Lumsden & DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.
- D'Alessandro-Bacigalupo A, Saravia NG 1992. *Trypanosoma rangeli*, p. 1-54. In JP Kreier, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed, vol 2, Academic Press, San Diego.
- Deane LM 1961. Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 15-28.
- Deane LM 1964. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol D Trop* 16: 27-48.
- Deane LM, Damasceno RG 1961. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 61-70.
- Deane LM, Deane MP, Lourenço-de-Oliveira R 1986. Are asian monkeys the original hosts of *Trypanosoma conorrhini*? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 127-129.
- Deane MP 1947. Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em "barbeiros" e em rato na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio NNN. *Rev Ser Esp Saúde Públ* 1: 433-442.
- Deane MP 1979. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*, p. A6-7. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro.
- Deane MP, Deane LM 1961. Studies on the life cycle of *Trypanosoma conorrhini*. "In vitro" development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 3: 149-160.
- Deane MP, Jansen AM 1990. Developmental stages of *Trypanosoma (Megatrypanum) freitasi* Rego, Magalhães & Siqueira, 1957 in the opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae). *J Protozool* 37: 44-47.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen A 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 513-515.
- Dias E 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 28: 1-110.
- Dias E. 1935. Revisão geral dos hemoflagelados de Chirópteros, p. 10-88. Novena Reunión de la Sociedad Argentina de Patologia Regional, Mendoza.
- Dias E, Seabra CAC 1943. Sôbre o *Trypanosoma conorrhini*, hemoparasito do rato transmitido pelo *Triatoma rubrofasciata*. Presença do vector infectado na cidade do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 39: 301-330.
- Hartmann M 1910. Notiz über eine weitere art der schizogonie bei *Schizotrypanum cruzi* (Chagas). *Arch Protistenk* 20: 361-363.
- Hoare CA 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *J Protozool* 11: 200-207.
- Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Howells RE, Chiari CA 1975. Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. *Ann Trop Med Parasitol* 69: 435-448.
- Marinkelle CJ 1976a. Biology of the trypanosomes of bats, p. 175-216. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.
- Marinkelle CJ 1976b. The biology of the trypanosomes of non-human primates, p. 217-256. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.
- Marinkelle CJ 1982. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 125-134.
- Molyneux DH 1976. Biology of trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma*, p. 285-325. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.
- Molyneux DH 1991. Trypanosomes of bats, p. 195-223. In JP Kreier, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed, vol 1, Academic Press, San Diego.
- Muniz J, Borriello A 1945. Estudo sôbre a ação lítica de diferentes sôros sôbre as formas de cultura e sanguícolas do "*Schizotrypanum cruzi*". *Rev Brasil Biol* 5: 563-576.
- Schmatz DM, Boltz RC, Murray PK 1983. *Trypanosoma cruzi*: separation of broad and slender trypomastigotes using a continuous hypaque gradient. *Parasitology* 87: 219-227.
- Sherlock IA, Carcavallo RU, Girón IG 1997. List of natural and experimental flagellate infections in several triatominae species, p. 289-298. In RU Carcavallo, IG Girón, J Jurberg, H Lent (eds), *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*, vol I, Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Silva LHP 1959. Observações sôbre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1: 99-118.
- Sogayar R 1978. *Infecção Experimental de Ratos Albinos Wistar com Diferentes Cepas de Trypanosoma cruzi Chagas 1909*, MSc Thesis, Universidade Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, 100 pp.

210 *T. cruzi* Morphobiological Characterization • Maria Auxiliadora de Sousa

- Sousa MA, Brito CMM, Alencar AA 1982. Aspectos do comportamento biológico de tripomastigotas sangüíneos finos e largos de uma mesma cepa de *Trypanosoma cruzi*, p. 138. Anais da IX Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, MG, Brazil.
- Steindel M, Grisard EC, Pinto CJC, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1998. Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol* 84: 601-607.
- Urdaneta-Morales S 1983. Pleomorphism in trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmed Parasit* 34: 225-228.
- Vianna G 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 276-294.
- Wells EA 1976. Subgenus *Megatrypanum*, p. 257-284. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.
- Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R 1998. Morphological features of trypanosomes from squirrel monkeys from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 45-55.
- Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R 1996. The haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas 1908. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 501-505.

A. A. Brandão · A. Miranda
W. M. Degrave · M. A. Sousa

The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications

Received: 7 January 2000 / Accepted: 1 March 2000

Abstract The kDNA minicircle size was analyzed in 15 species of choanomastigote-shaped trypanosomatids and four main groups of species were identified: (1) “*Crithidia*” *deanei*, “*C.*” *desouzai* and “*Herpetomonas*” *roitmani*, which presented the largest molecules (\geq 3,800 bp), (2) “*C.*” *oncopelti* with minicircles of at least four different sizes within 1,300–2,650 bp, (3) *C. fasciculata*, *C. guilhermei* and *C. luciliae*, having at least two sizes of minicircle (2,650 bp and 3,000 bp) and (4) a heterogeneous group of species presenting minicircles of a single size, including several *Crithidia* spp. (having 1,600 bp or 1,700 bp minicircles) and two *Proteomonas* spp. presenting the smallest minicircles (about 1,500 bp). These results were compared with other observations and discussed from a taxonomic point of view.

Introduction

Trypanosomatids are parasite protozoans of vertebrates, plants and/or insects, some of them being important etiologic agents of diseases in humans and/or animals, such as the American and African trypanosomiasis and the leishmaniasis. At present, the trypanosomatids have been allocated to nine largely accepted genera (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Sauroleishmania*

and *Trypanosoma*) both on the basis of their morphological features under the optical microscope and on whether they are monoxenous or heteroxenous (Hoare and Wallace 1966; Vickerman 1976; Killick-Kendrick et al. 1986). In recent years, two new genera have been proposed, *Proteomonas* (Podlipaev et al. 1990) and *Angomonas* (Sousa and Côte-Real 1991), to accommodate choanomastigote-shaped species bearing features which do not allow their inclusion in *Crithidia* or other recognized genera.

The most striking feature of the trypanosomatids is the presence of the kinetoplast, a mitochondrial organelle with a prominent DNA mass (kDNA) located near the basal body. The kDNA is composed of a network of two kinds of circular DNA molecules: the maxicircles, large molecules at low copy number, which functionally correspond to conventional mitochondrial DNA, and the minicircles, small molecules in high copy number, heterogeneous in sequence and whose function has been related to the coding of guide RNAs involved in the editing process of maxicircle transcripts (Simpson 1987; Sturm and Simpson 1990). Minicircles contain conserved and variable regions and different sequence classes can be found in the same network. The conserved regions possess the origin of replication for both strands (Ray 1989). These features of minicircle DNA constitute the basis for diagnostic and typing tests of trypanosomatids (Morel et al. 1980; Sturm et al. 1989; Degrave et al. 1994; Fernandes et al. 1996).

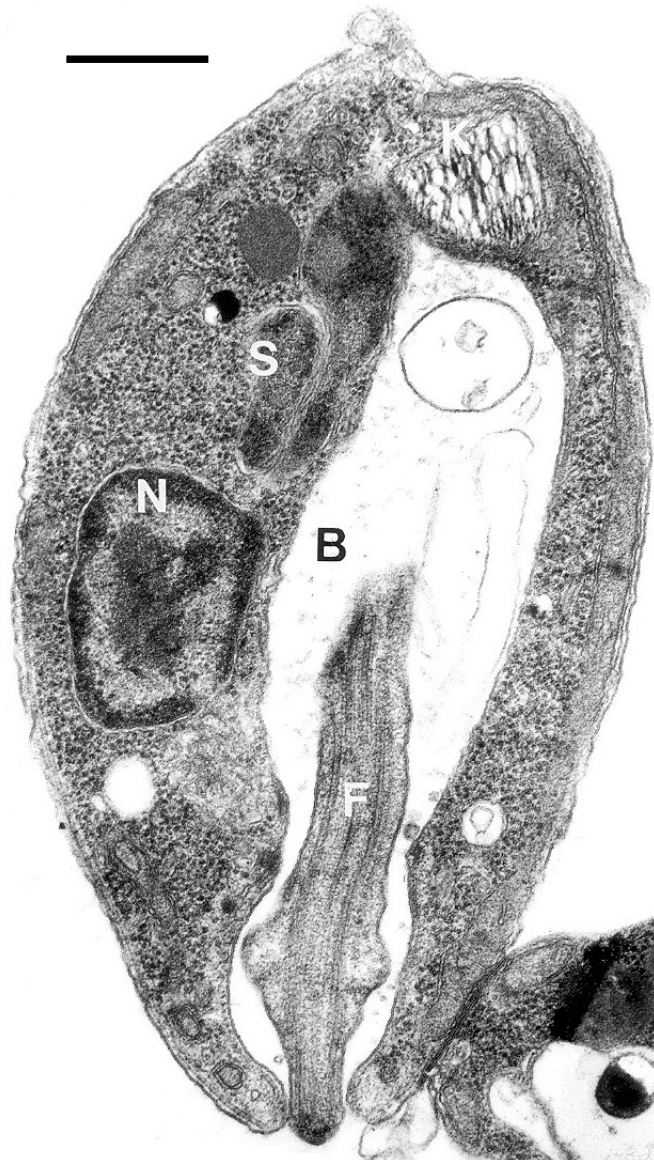
In the present paper, we investigate the kDNA minicircle size in 15 species of trypanosomatids which present the choanomastigote stage and are deposited in the Trypanosomatid Culture Collection at the Oswaldo Cruz Institute. Choanomastigotes are considered the typical stage for the genus *Crithidia*, although not all species mentioned here are at present described as *Crithidia*. This stage presents a kinetoplast usually anterior to the nucleus and the flagellum emerges at the anterior end of the body from a wide funnel-shaped reservoir (Hoare and Wallace 1966).

M. A. Sousa (✉)
Coleção de Tripanosomatídeos,
Departamento de Entomologia,
Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365,
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: masousa@gene.dbbm.fiocruz.br
Fax: + 55-21-2909339

A. A. Brandão · A. Miranda · W. M. Degrave
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Avenida Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro,
RJ, Brazil

Ultraestrutura de *Angomonas deanae* (= *Angiomonas deanei*)

SOUSA MA, CÔRTE-REAL S 1991. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33 (Supl 8): S8.



Angomonas deanei Sousa & Côrte-Real 1991 (= *Crithidia deanei*). Microscopia eletrônica de transmissão. (N) núcleo. (K) cinetoplasto. (S) simbiote bacteriano. (B) bolsa flagelar. (F) flagelo. Escala: 5 μ m.

Foto: Suzana Côrte-Real.

Resumos de trabalhos publicados em periódicos e relacionados aos temas abordados na tese (1994-2000)

Sousa MA, Camargo AC, Costa KCF 1994. Differentiation to opisthomastigote in trypanosomatids allocated in the genus <i>Crithidia</i> . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 89 (Suppl. I): 224	7.3.1
Sousa MA, Camargo AC, Costa KCF, Tavares CC, Deane MP 1994. Molecular karyotype of lower trypanosomatids: genus <i>Crithidia</i> . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 89 (Suppl. I): 253	7.3.2
Sousa MA, Costa KCF, Camargo AC, Santos SM, Ziccardi M, Freshi JM, Attias M 1995. Characterization of a trypanosomatid isolated from <i>Phthia picta</i> (Hemiptera: Coreidae) . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 90 (Suppl. I): 246	7.3.3
Camargo AC, Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Campêlo AG, Ziccardi M, Cavazzana Jr M, Kaneshima EN, Itow-Jankevicius S 1996. On the polymorphism of <i>Herpetomonas dedonderi</i> Dedet et al., 1986 . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 91 (Suppl.): 93	7.3.4
Sousa MA, Camargo AC, Campêlo AGS, Abrantes J, Sá-Xavier C, Brazil RP, Tavares CC 1996. Molecular karyotype analysis of lower trypanosomatids . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 91 (Suppl.): 102	7.3.5
Sousa MA, Tavares CC, Fiorini JE, Sá-Xavier C, Campêlo AG, Santos SM, Cucolichio G 1997. <i>Herpetomonas</i> from plants and phytophagous hemipterans: are some <i>Herpetomonas</i> spp. heteroxeneous? <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 92 (Suppl. I): 130	7.3.6
Sá-Xavier C, Santos SM, Sousa MA 1998. A new trypanosomatid belonging to the genus <i>Crithidia</i> isolated from <i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera: Reduviidae) . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 93 (Suppl. II): 95	7.3.7
Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Branco DCB 1998. Cellular differentiation and growth in axenic culture of trypanosomatids allocated in the genus <i>Leptomonas</i> (Protozoa: Kinetoplastida) . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 93 (Suppl. II): 100	7.3.8
Sousa MA, Madeira MF, Cupolillo E, Santos SM, Sá-Xavier C, Soares MJ, Brazil RP, 1998. Characterization of a <i>Herpetomonas</i> sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from <i>Nectomys squamipes</i> (Mammalia: Rodendia) . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 93 (Suppl. II): 101	7.3.9
Sousa MA, Barrett TV, Naiff RD, Branco DCB, Sá-Xavier C, Santos SM, Cysne L, Brandão A 1998. <i>Leptomonas</i> sp. isolated from <i>Lutzomyia ayrozai</i> (Diptera: Psychodidae) . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 93 (Suppl. II): 127	7.3.10
Sousa MA, Sá-Xavier C, Santos SM, Branco DCB 1998. Cellular differentiation in trypanosomatids isolated from plants: usefulness of morphological characters to identify <i>Phytomonas</i> . <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> 93 (Suppl. II): 221-222	7.3.11
Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Branco DCB 1998. The <i>Leptomonas</i> genus analysed by morphobiological parameters: taxonomic implications . <i>Phytomonas Newsletter</i> 18: 4	7.3.12

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 89, Suppl. I, November, 1994/ Page 224

P2 - 13

DIFFERENTIATION TO OPISTHOMASTIGOTE IN TRYPANOSOMATIDS ALLOCATED IN THE GENUS Crithidia

Sousa, M.A.; Camargo, A.C. & Costa, K.C.F.

Depto. Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ

Trypanosomatids are allocated in different genera basically considering their evolutive stages and hosts required for their life cycle; more recently molecular and biochemical approaches have provided helpful markers for their generic identification. In this group of parasites, an important taxonomic question was raised when the opisthomastigote stage, typical of the Herpetomonas genus, was also described in Crithidia deanei. In order to verify the frequency of opisthomastigotes in the Crithidia genus, we studied the kinetoplast migration towards the protozoan posterior end during the growing curves of six established species, without employing any know differentiation inducing drug. All species were grown at 27.3o C in folic acid-yeast extract-trypticase-sucrose (FYTS) medium supplemented with 10% fetal calf serum during 168h, samples being collected at 24h intervals to determine the number of parasites/ml and to prepare Giemsa stained smears. Our results evidenced that the presence of opisthomastigotes is a constant feature (found in all cultivation days) not only in C. deanei (clone A2), but also in C. desouzai (clone B3) and C. oncopelti (ATCC 12982) (symbiont-bearing species), being very rare in C. luciliae (only one form was seen); otherwise, under our cultivation condition, opisthomastigotes were not found in C. fasciculata (ATCC 12858) and in C. acanthocephali. The taxonomic significance of these results is beinf investigated also at the molecular level.

Supported in part by CNPq

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 89, Suppl. I, November, 1994/ Page 253

PZ - 72

MOLECULAR KARYOTYPE OF LOWER TRYPANOSMATIDS: GENUS Crithidia

Sousa, M.A., Camargo, A.C., Costa, K.C.F., Tavares, C.C. (*) & Deane, M.P.

Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ

(*) Depto. de Biologia Celular e Genética, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, R.S. Francisco Xavier, 524, 20550-013 Rio de Janeiro, RJ

We have used the contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis to analyse the molecular karyotype of different species of trypanosomatids allocated in the *Crithidia* genus. Three pulse ramps have been assayed: 300-200 sec (20h), 200-100 sec (24h), 100-50 sec (40h), respectively using 0.8, 1.0 or 1.5 % agarose gels in 0.5 X TBE (45 mM Tris, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA, pH 8.0). *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA was used as molecular weight marker. Great polymorphism in the banding patterns was observed, so that under the above-mentioned conditions it was not possible to resolve the molecular karyotype of all species studied. Very similar banding patterns were observed in *Crithidia deaneai* and *C. desouzai* (two closely related species by morphobiological parameters), their chromosomes probably ranging from 1,600 to 500 Kb; *C. guilhermei* and *C. luciliae* also presented a somewhat similar pattern with 2,200-700 Kb bands, while *C. acanthocephali* exhibited a peculiar banding pattern, distinguishing it from the other species. These results confirm the potentiality of the karyotype analysis by using CHEF electrophoresis for typing and grouping trypanosomatids.

Support in part by CNPq

PZ-010

CHARACTERIZATION OF A TRYPANOSOMATID ISOLATED FROM *PHTHIA PICTA* (HEMIPTERA: COREIDAE)

Sousa, M.A.¹, Costa, K.C.F.¹, Camargo, A.C.¹, Santos, S.M.¹, Ziccardi, M.², Freschi, J.M.³ & Attias, M.³

Departamento de Protozoologia¹ e Dep. Entomologia², Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ. Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro³.

Brazil *et al.* (1990, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 239-240) isolated in axenic culture a trypanosomatid from the salivary gland of a phytophagous hemipteran (*Phthia picta*) collected on tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) identifying it as a *Phytomonas* sp.. This isolate is deposited in the "Trypanosomatid Collection" of the Oswaldo Cruz Institute (CT-IOC 13) and has been further characterized at the morphobiological, biochemical and ultrastructural level.

In liver infusion-tryptose (LIT) medium, this isolate presented the maximum growth within 48 h (about 5×10^7 parasites/ml). Promastigotes and paramastigotes were found in all cultivation days (the first ones predominating); opisthomastigotes were seen from 96-216 h, although at low rates (near 1%). The promastigotes generally presented a pointed posterior end and the nucleus near the middle of the body; they measured (mean and standard deviation) $12.8 (\pm 3.7) \mu\text{m}$ in length (without flagellum), $1.7 (\pm 0.6) \mu\text{m}$ in width, having a free flagellum of $9.8 (\pm 3.0) \mu\text{m}$. The opisthomastigotes were smaller and broader, averaging $7.7 (\pm 1.4) \mu\text{m}$ of length, $2.4 (\pm 0.4) \mu\text{m}$ in width and having a free flagellum of $5.9 (\pm 1.7) \mu\text{m}$. The isolate was characterized by probing certain enzymes of the ornithine-arginine metabolism, presenting ornithine carbamoyltransferase, citrulline hydrolase and arginine deiminase, but not arginase (S. Itow-Jankevicius, personal communication). Regarding such enzymatic pattern and the presence of opisthomastigotes we have considered this isolate a *Herpetomonas* species. Its ultrastructural organization followed the general pattern of other trypanosomatids, including some interesting systems as cytopharynx and a contractile vacuole. A remarkable feature of this isolate is the constant presence (during about 3 years in LIT) of pairs of apposed cells (either two promastigotes or a long promastigote and a bell-shaped cell) suggesting a mating process similar to that described in *Herpetomonas megaseliae* (Sousa, 1994, *Parasitol. Res.*, 80: 112-116).

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 91, Suppl., November, 1996/ Page 93

064

ON THE POLYMORPHISM OF *Herpetomonas dedonderi* DEDET ET AL., 1986.

Camargo, A.C.¹, Sousa, M.A.¹, Santos, S.M.¹, Sá-Xavier, C.¹, Campelo, A.S.G.¹, Ziccardi, M.², Cavazzana Jr., M.³, Kaneshima, E.N.³ & Itow-Jankevicius, s.³

Deptos Protozoologia¹ & Entomologia², Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, R.J.
Depto Patol. Geral³, CCB, Univ. Estadual de Londrina, Paraná.

Herpetomonas dedonderi is an interesting trypanosomatid isolated from the culicid *Haemagogus janthinomys* (J. Protozool., 33: 530-533). Its taxonomic position within the genus *Herpetomonas* has been discussed on the basis of morphological, biochemical and molecular data (Camargo et al, 1992; J. Parasit., 78: 40-48). The Dedet's isolate was not cloned and regarding the occurrence in its cultures of choanomastigote-like cells together with slender and elongated forms, we considered the possibility of this strain being a mixture. On account of this, the isolate was cloned in an electronic programmable individual cell sorter and a clone randomly selected (B4). This clone was indistinguishable morphologically from the original isolate, likewise seeming a mixed population; then, it was subcloned in a 96-microwell plate by seeding 2µl of a parasite suspension (with about 250 cells/ml) in each well containing LIT medium. In the present work we have characterized the clone B4 and three randomly chosen subclones (SC10D, SC6G and SC7E) at the morphobiological, biochemical and molecular levels. Our results evidenced that these cloned stocks were indistinguishable morphologically, their more striking feature being a well-marked change in the morphological aspect of the population during growth in culture. At 48 h, the cultures presented almost exclusively very slender promastigotes (about 90-100%), resembling sewing needles. However, from 96 to 144 h the cultures became heterogeneous, with gradual increase in number of shorter and broader cells (about 2-3 times wider than 48 h promastigotes), seeming choanomastigotes, but usually without truncate anterior end; some of such forms presented paranuclear (15-33% of cells, at 144 h) or postnuclear kinetoplast (1.4-2.6% in the subclones and 4.3% in clone B4, at 144 h); these populations resembled the original illustrations of *H. dedonderi* at 96 h in LIT medium. These cloned stocks were assayed for the presence of enzymes of ornithine-arginine metabolism displaying, as described for the original isolate (Camargo et al., 1992), arginase and citrulline hydrolase, an enzymatic pattern commonly found in *Crithidia* species. All clones appeared identical when examined by pulsed field gel electrophoresis in 1% agarose gels, under 220-100 s pulse ramp, at 5.5V/min, for 24 h. Our studies suggest that *H. dedonderi* is not a mixed strain, but rather a very peculiar species, although at present we can not conclusively suggest another generic position for it.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 91, Suppl., November, 1996/ Page 102

084

MOLECULAR KARYOTYPE ANALYSIS OF LOWER TRYPANOSOMATIDS

SOUSA, M.A.¹, CAMARGO, A.C.¹, CAMPELO, A.G.S.¹, ABRANTES, J.¹, SÁ-XAVIER, C.¹, BRAZIL, R.P.² & TAVARES, C.C.³.

(1) Depto Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ; (2) Lab Leishmaniose, C. P. René Rachou; (3) Depto Biologia Celular e Genética, Instituto Biologia, UERJ

Forty-four isolates of trypanosomatids allocated in different genera (*Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia* and *Proteomonas*) have been comparatively analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) under different running conditions using a CHEF DR III apparatus (Bio Rad). Although each isolate presented a peculiar banding pattern, great similarity was observed between some species, as *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*, as well as great differences within a same species, being noteworthy the case of *H. muscarum muscarum* and *H. m. ingenoplastis* and two strains of *C. fasciculata* (ATCC 11745 and 12857). The majority of the strains (79%) presented the upper chromosomal band around 2,200 kb (although the occurrence of higher ones can not be excluded in a few species); however, we did not evidence such band in *H. megaseliae*, *H. m. muscarum*, *H. m. ingenoplastis*, a *Herpetomonas* sp. from *Phthia picta*, *Phytomonas davidi*, a *Phytomonas* sp. from *Euphorbia hyssopifolia*, *Leptomonas costoris*, *L. collosoma*, as well as in *H. roitmani*, *C. deanei*, *C. desouzai* and *C. oncopelti*. It is interesting to note that previous studies (Sousa & Côte-Real, 1991; Sousa et al, 1994; Faria-e-Silva, 1994) have evidenced that these four latter species always present cells with postnuclear kinetoplast, sometimes at very high rates, despite being choanomastigotes (stage which we are naming metachoaomastigote, instead of opisthomastigote). Moreover, it is noteworthy that other species allocated in the *Crithidia* genus presented such upper chromosomal band around 2,200 kb. The majority of the species under investigation (84%) did not present chromosomes below 365 kb, although bands lower than 225 kb appear to occur in *H. m. ingenoplastis*. Among the isolates examined, those presenting fewer chromosomal bands were *L. pulexsimulantis*, *Phytomonas serpens* (9t) and two other *Phytomonas* sp., one isolated from *Allamanda cathartica* and the other from *Jathropha macrantha*. Our results reinforce the discussion on the taxonomic position of some species, besides confirming the usefulness of PFGE to identify, characterize, arrange strains in groups, and to control the authenticity of species deposited in collections.

HERPETOMONAS FROM PLANTS AND PHYTOPHAGOUS HEMIPTERANS: ARE SOME HERPETOMONAS spp. HETEROXENEOUS?

Sousa, M.A.⁽¹⁾, Tavares, C.C.⁽²⁾, Fiorini, J.E.⁽³⁾, Sá-Xavier, C.*⁽¹⁾, Campêlo, A.G.**⁽¹⁾, Santos, S.M.⁽¹⁾ & Cocolichio, G.***⁽¹⁾

(1) - Coleção de Trypanosomatídeos, Depto Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, CP 926 - 20001-970 Rio de Janeiro, RJ; (2) Depto Biologia Celular e Genética, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; (3) Depto Ciências Biológicas, UNIFENAS, Alfenas, MG.

Fiorini *et al.* isolated from a tomato fruit and a hemipteran *Phthia picta* captured on it, as well as from *Leptoglossus stigma* found in association with oranges, trypanosomatids which were identified as *Phytomonas* (*Cytobios* 75: 163-170, 1993; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85 suppl: 134, 1990). These strains were deposited in the Trypanosomatid Collection at the Oswaldo Cruz Institute under the code number CT-IOC 229, 228 and 221, respectively. They were indistinguishable from each other when examined in Giemsa-stained smears, but considerably differed from six isolates of tomatoes and phytophagous hemipterans obtained by Jankevicius & Itow-Jankevicius, all identified as *Phytomonas serpens*.

These strains were comparatively analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) under different running conditions and by molecular hybridization using β -tubulin gene probes. The growth and cellular differentiation in LIT medium at 27.3°C was also compared in the isolates obtained by Fiorini *et al.* and in two *P.serpens* strains (9T and 1G). Two *Herpetomonas* species from insects (*H. megaseliae* and *H. muscarum muscarum*) and two others from plants (*H. davidi* and the isolate of *Euphorbia hysopifolia* obtained by Attias & De Souza 1986) were included in the present study as references. We evidenced that the isolates obtained by Fiorini *et al.* in fact belonged to the *Herpetomonas* genus, since they presented paramastigotes and opisthomastigotes (although at low rates) in their cultures; these stages were not found in the organisms identified as *P. serpens*. The isolates obtained by Fiorini *et al.* presented identical DNA banding pattern by PFGE, as well as the same localization of β -tubulin genes, both being similar to those presented by the *Herpetomonas* species, this confirming their generic identification. The six *P. serpens* strains were similar to each other and also similar to a new isolate obtained from tomato and *Phthia picta* insects from Alfenas (MG), all being clearly distinct from the *Herpetomonas* species.

Our results evidence that a same trypanosomatid belonging to the *Herpetomonas* genus can be isolated both from a plant and phytophagous insects. The question which arises is whether at least some *Herpetomonas* species can be heteroxenous. It is worthy mentioning that the so-called "*Phytomonas*" *davidi* was experimentally transmitted from plant to plant through the hemipteran *Pachybrachius bilobata scutellatus* (McGhee & Postell 1982), that parasite possibly being the *H. davidi*. Interestingly, another trypanosomatid isolated in axenic culture from *Phthia picta* (salivary glands) was also identified as a *Herpetomonas* sp. (Sousa *et al.* 1995).

(CNPq*, FAPERJ**, FAPEMIG*** Fellowships)

BI-21**A NEW TYRANOSOMATID BELONGING TO THE GENUS *CRITHIDIA* ISOLATED FROM *ZELUS LEUCOGRAMMUS* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)**

Sá-Xavier C, Santos SM, Sousa MA

Coleção de Tripanosomatídeos, Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

In this work we studied a trypanosomatid isolated by MP Deane and N Thomaz in 1991 from a predacious hemipteran (*Zelus leucogrammus*) captured in Belo Horizonte (MG, Brasil). After cloning in a 96-microwell plate (as described by AC Camargo et al. in 1996), a randomly chosen clone (code CT-IOC 193 in the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute) was characterized with regard to the growth and differentiation pattern in liver infusion-tryptose (LIT) medium at 27.3°C. The cultures were studied from 48 to 144 hr, samples being collected at 24 hr intervals, either to determine the number of cells/ml and to prepare Giemsa-stained smears for morphological and morphometric studies. We evidenced that this trypanosomatid grew very easily, reaching $\sim 0.8 \times 10^8$ cells/ml within 72-96 hr. It was typically choanomastigote in shape, presenting the majority of the cells (60.3%, average from 48-144 hr data) with paranuclear kinetoplast; no cells with postnuclear kinetoplasts were found (metachoaomastigotes). In 1.6% of the population (mean percent from 48-144 hr), the flagellum was partially inside the cell body, resembling a question mark. In the majority of the dividing cells (54%) both kinetoplasts were placed at the side of the nuclei and, in 36%, at least one of the dividing kinetoplasts was paranuclear. Only 10% of cells in division had the kinetoplasts before the nuclei. The main evolutive stage of this organism (cells with paranuclear kinetoplast) presented $7.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$ in length, $2.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in width, flagellum of $6.9 \pm 1.7 \mu\text{m}$, and nuclear index of 1.1 ± 0.2 (mean and standard deviation). Several data from the morphobiological characterization of this clone were numerically coded for computational processing and compared with those from other choanomastigote-shaped species (10 *Crithidia* spp., *Proteomonas inconstans*, as well as the so-called "*Crithidia*" *deanei* which belongs to a new genus named *Angomonas* by Sousa & Côrte-Real, 1991). The phenetic analysis using the Jaccard or Simple Matching coefficients and the UPGMA clustering algorithm confirmed the affinities of this organism with the *Crithidia* species, mainly with *Crithidia hutneri*. The molecular analysis using contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis showed that this organism has a unique DNA chromosomal banding pattern, distinguishing it from all *Crithidia* species analyzed herein, including *C. hutneri*. All these findings led us to consider that this trypanosomatid can be a new *Crithidia* species.

CNPq Fellowship, PIBIC.

BI-32**CELLULAR DIFFERENTIATION AND GROWTH IN AXENIC CULTURE OF TRYPANOSOMATIDS ALLOCATED IN THE GENUS *LEPTOMONAS* (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA)**

Sousa MA, Santos SM, Sá-Xavier C, Branco DCB

Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

The genus *Leptomonas* includes monoxenous parasites, mainly from insects, typically presenting the promastigote stage and, sometimes, flagellar "cysts". This genus has been considered a heterogeneous group by biochemical and molecular markers, possibly encompassing organisms from other taxa. In the present work we followed the cellular differentiation and growth in the Yaeger's LIT medium (27.3°C) of several isolates allocated in this genus: *L. collosoma*, *L. seymouri*, *L. pyrrocoris*, *L. costoris*, *L. lactosovorans*, *L. pulexsimulantis*, *L. mirabilis*, *Leptomonas* sp. isolated from *Oncopeltus fasciatus* (Romeiro *et al.* 1998), as well as the so-called "*Leptomonas*" *samueli*, considered a *Herpetomonas* by Camargo *et al.* in 1992. The cultures were started with 5×10^5 cells/ml seeded in 4 ml-volumes of medium distributed in 16x150mm screwcap tubes and studied at 24 hr intervals, from 48-144 hr. The percentage of each evolutive stage was determined by examining at least 500 randomly chosen cells in Giemsa-stained smears from each time, excepting for *L. mirabilis* (100-200 cells/day). All species presented, besides the typical and predominant promastigotes, the paramastigote stage, this occurring at rates ranging from 0.6 ("*L.*" *samueli*) to 38.2% (*L. mirabilis*). Cells with postnuclear kinetoplasts (opisthomastigotes) were also found in some species (mean): *L. lactosovorans* (0.2%), *L. pulexsimulantis* (0.2%) and *L. mirabilis* (1.2%), as well as in "*Leptomonas*" *samueli* (0.1%). Aflagellated cells were either absent or found in some species at rates $\leq 0.1\%$ (*L. seymouri*, *L. pyrrocoris*, *L. collosoma*, "*Leptomonas*" *samueli*). In the other species, aflagellated cells having the kinetoplast either before or beside the nucleus were found at rates averaging from 0.3-2.8%. "*Leptomonas*" *samueli* and *L. lactosovorans* also presented aflagellated cells with postnuclear kinetoplast. Some species grew very easily (*L. seymouri*, *L. pyrrocoris*, *L. collosoma*), others grew well, but at a lower extent ("*Leptomonas*" *samueli*, *L. lactosovorans*, *Leptomonas* sp. from *Oncopeltus fasciatus*), while *L. costoris*, *L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis* displayed very poor growth. Our results also suggest that "*L.*" *samueli* can be a *Herpetomonas*, and that the so-called *L. lactosovorans* can belong to this genus as well, although this needs confirmation. Otherwise, despite the presence of opisthomastigotes in cultures of *L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis*, their poor growth in LIT medium distinguishes them from the typical *Herpetomonas*; this led us to consider them rather *incertae sedis* species, and arises the question that the genera presently accepted are insufficient to encompass the actual diversity of the trypanosomatids. Our results also evidence that the species here examined morphologically differ from well-characterized *Phytomonas* spp., although two of them present high rates of twisted cells (*L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis*).

BI-33**CHARACTERIZATION OF A *HERPETOMONAS* SP. (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) ISOLATED FROM *NECTOMYS SQUAMIPES* (MAMMALIA: RODENTIA)**

Sousa MA, Madeira MF*, Cupolillo E**, Santos SM, Sá-Xavier C, Soares MJ***, Brazil RP****

Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Entomologia **Departamento de Imunologia ***Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ *Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública; Rio de Janeiro, RJ ****Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil

A trypanosomatid isolated from a hind-foot lesion of a rodent captured in the locality of Catimbau Grande, Rio Bonito (RJ, Brazil) was deposited in the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute, receiving the code number CT-IOC 219. It presented promastigotes and had been identified as *Leishmania* sp.; however, it was unable to infect hamster, otherwise easily growing in axenic cultures. In the present work, the original strain and a clone obtained from it (CT-IOC 220) were characterized by different approaches. Then, their growth at 27.3°C in the Yaeger's LIT medium was followed from 48 to 144 hr, at 24 hr intervals, samples of each culture being collected for morphological studies. We evidenced that both isolates grew easily, reaching $> 5 \times 10^7$ cells/ml within 48-72 hr, and presented pro-, para- and opisthomastigotes in Giemsa-stained smears, as a typical *Herpetomonas* species. Promastigotes from the original isolate and its clone presented similar sizes, having respectively 10.5 ± 1.8 and 11.1 ± 2.0 μm in length, 2.4 ± 0.4 and 2.3 ± 0.4 μm in width, free flagellum of 8.8 ± 2.5 and 9.0 ± 2.5 μm , and 1.1 ± 0.3 and 1.0 ± 0.4 of nuclear index. Peculiar pairs of cells suggesting a sexual process and similar to those reported in other *Herpetomonas* spp. were also found. Murine macrophages cultured *in vitro* at 37°C quickly internalized these parasites, destroying the majority of them within 24 hr; at that time no dividing amastigotes were found and several parasites were alive in the supernatant medium. The ultrastructural analysis of the promastigotes displayed the typical organization of the trypanosomatids. The original strain and its clone presented identical chromosomal DNA banding pattern when analyzed by contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis, this pattern being greatly similar to that presented by a group of well-characterized *Herpetomonas* species (*H. muscarum muscarum*, *H. megaseliae*, three *Herpetomonas* spp. from plants and one from a phytophagous hemipteran), a noticeable feature shared by them being the lack of a chromosomal band around 2,200 kb. The similarity of these isolates with the above-mentioned *Herpetomonas* species was also confirmed by isozyme analysis. A possible infection of a mammal by a *Herpetomonas* was first noticed by McGhee and Cosgrove in 1980, the parasite having been isolated from the liver of a woman. More recently, other putative monoxenous trypanosomatids were isolated from HIV-infected patients. All these findings reinforce the discussion whether some *Herpetomonas* species can include hosts other than insects in their life-cycle or whether, under special conditions, they can determine accidental and/or opportunistic infections.

BI-87**LEPTOMONAS SP. ISOLATED FROM THE SANDFLY *LUTZOMYIA AYROZAI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Sousa MA, Barrett TV***, Naiff RD***, Branco DCB, Sá-Xavier C, Santos SM, Cysne L*, Brandão A**

Coleção de Tripanosomatídeos, Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia

*Departamento de Protozoologia **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil ***I.N.P da Amazônia, Caixa Postal 478, 69011-970 Manaus, AM, Brasil

Trypanosomatids belonging to the genera *Leishmania*, *Endotrypanum* and *Trypanosoma* have been isolated on several occasions from phlebotomines, but few reports exist on presumed monoxenous parasites isolated from these hosts. In the present work, we characterized two isolates (IM 3943 e IM 3944) obtained from *Lutzomyia ayrozai* captured in August 1993 in Porto Urucu (State of Amazonas, Brazil) with a view to determine their generic identification. Both isolates presented promastigotes in axenic cultures and were unable to infect hamsters. Then, they were cloned in a flow cytometer and a clone from each one (IM 3943-c and IM 3944-c) was studied with regard to the capacity of multiplication within macrophages *in vitro*, growth, morphological differentiation and division process in the Yaeger's LIT medium at 27.3°C (from 48-144 hr). A morphometric analysis of the predominant stage found in these cultures was carried out as well. The kDNA minicircle size of both isolates was estimated and compared with those from two reference strains of *Endotrypanum* and with data published on *Leishmania* species.

These clones were unable to multiply within macrophages and grew well in LIT medium, reaching the maximum growth (3×10^7 cells/ml) within 72-96 hr. As seen in Giemsa-stained smears, slim promastigotes greatly predominated and were very similar in both clones. Paramastigotes also could be found, although at low percent (averages: 0.1% in IM 3943-c and 1.1% in IM 3944-c). Aflagellated cells were absent. No opisthomastigote was seen, then discarding the possibility of these clones belonging to the *Herpetomonas* genus. During the division process, in both clones, the nuclei were predominantly placed at different planes. However, in IM 3944-c, the majority of dividing cells (93%) presented the two kinetoplasts before the nuclei, while in IM 3943-c the kinetoplasts presented two main positions: (1) both being placed before the dividing nuclei (45% of the dividing cells) and (2) one kinetoplast placed before the nuclei, while the other was paranuclear (49%). The promastigotes of IM 3943-c and IM 3944-c were similar in size, having respectively 13.0 ± 3.2 and 14.3 ± 3.5 μm in length, 1.7 ± 0.2 and 1.6 ± 0.2 μm in width, free flagellum of 12.9 ± 4.3 and 13.3 ± 4.3 μm , and 1.5 mean nuclear index. The kDNA minicircle size of these clones was estimated at 2.3 kb, then being markedly higher than those of *Endotrypanum* and *Leishmania* spp. (0.8-0.9 kb). All these findings led us to consider these isolates as varieties of a same species, which do not belong to the *Leishmania* or *Endotrypanum* genera, otherwise having morphological features of a *Leptomonas* sp. The IM3943-c and IM3944-c cultures are deposited in the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute under the codes CT-IOC 100 and CT-IOC 058, respectively.

IM-24**CELLULAR DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMATIDS ISOLATED FROM PLANTS: USEFULNESS OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS TO IDENTIFY *PHYTOMONAS***

Sousa MA, Sá-Xavier C*, Santos SM, Branco DCB

Coleção de Tripanosomatídeos, Depto Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

In the present work we studied at the morphobiological level eight isolates of plant trypanosomatids, which have been confirmed as *Phytomonas* or *Herpetomonas* by at least two of the following approaches: isozyme analysis, reactivity with selected monoclonal antibodies or lectins, arginase detection, analysis of restriction sites in some rDNA sequences, and by molecular hybridizations using probes derived from kDNA, rDNA or SL genes. The *Herpetomonas* were: *H. davidi* (previously named *P. davidi*) and the isolate of *Euphorbia hyssopifolia*. The *Phytomonas* were: *P. serpens*, the isolates obtained from *Euphorbia pinea*, *Jathropha macrantha*, *Allamanda cathartica*, *Citrus bergamia*, as well as the so-called "*H.*" *mcgheei*. Three well-characterized *Herpetomonas* species isolated from insects were also studied as references. We were looking for a character only shared by the *Phytomonas* isolates, and which could be considered of diagnostic value. Then, we followed the cellular differentiation of these isolates in LIT medium at 27.3°C, at 24 hr intervals, from 48 to 120 hr. The cultures were started with 5×10^5 cells/ml seeded in 4 ml-volumes of medium distributed in 16x150mm screwcap tubes. The percentage of the different evolutive stages was determined by examining about 300-500 randomly chosen cells in Giemsa-stained smears. Paramastigotes and opisthomastigotes were detected only in isolates identified as *Herpetomonas*. On the other hand, in all *Phytomonas* cultures occurred both a type of promastigote presenting a very short flagellum and similar forms without an apparent flagellum. These aflagellated forms are very peculiar and were found at rates ranging (mean) from 1.9% ("*H.*" *mcgheei*) to 51.4% (*Phytomonas* from *Allamanda cathartica*), but they were not seen in the *Herpetomonas*. They had already been seen in *P. serpens*, "*H.*" *mcgheei* (in the plant) and other *Phytomonas* spp., but have not been reported in other genera. Then, we believe they are useful morphological markers to identify *Phytomonas*. It is worthy mentioning that these aflagellate forms are distinct from amastigotes of *Leishmania* and *Trypanosoma*, as well as from "cysts" of *Leptomonas*. In the majority of *Phytomonas* cultures we also observed a type of division producing one cell with flagellum and another without it; it seems possible that this division would be a source of aflagellated forms. Otherwise, although long twisted promastigotes are common in *Phytomonas* in the host plants, they were rare or not seen in the majority of the cultures examined herein. Our data also evidenced that the presence of paramastigotes in trypanosomatids from plants should be considered a clue, to be confirmed, that the isolate can be a *Herpetomonas* sp.

Nota importante:

Este resumo substitui aquele com o mesmo título que foi publicado em 1997 (*Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, Suppl I: 85) com muitos erros que não faziam parte do texto original dos autores.

PHYTOMONAS NEWSLETTER 18: 4 (1998)

**NEWS
FROM AROUND THE WORLD**

◆ *From Brazil*

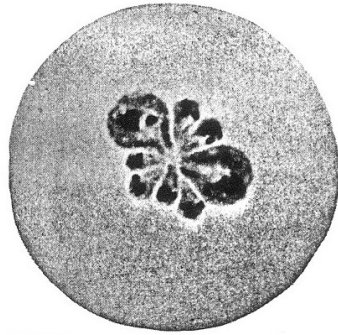
- 1) The *Leptomonas* genus analysed by morphobiological parameters: taxonomic implications. M. A. Sousa, S. M. Santos, C. Sá-Xavier & D. C. Branco. Coleção de Tripanosomatídeos, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

"In the present work seven species previously allocated to the *Leptomonas* genus were analysed with regard to morphological features in Giemsa-stained smears and growth in LIT medium at 27.3°C. All of them presented promastigotes and paramastigotes, but opisthomastigotes were also found in *Leptomonas lactosovorans*, *L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis*. Aflagellate cells were absent or occurred at low rates (<3.5%). *L. seymouri*, *L. pyrrocoris*, *L. collosoma* grew very easily in LIT medium, *L. lactosovorans* also grew well, although to a lesser extent, but *L. costoris*, *L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis* showed very poor growth. The possibility of *L. lactosovorans* belonging to *Herpetomonas* genus has been considered. However, despite the occurrence of opisthomastigotes in *L. pulexsimulantis* and *L. mirabilis*, at present we are considering them *incertae sedis* since they also display uncommon features of *Herpetomonas* (fastidious growth in culture and high percent of twisted cells). These data reinforce the hypothesis that the generic name *Leptomonas* covers a mixture of taxa which can account, at least in part, for the biochemical and molecular heterogeneity reported within this genus (Kolesnikov *et al.* 1990, Camargo *et al.* 1992). Our results also evidence that: (1) the paramastigote stage should be included in the diagnosis of the *Leptomonas* genus, (2) twisted cells are not exclusive to *Phytomonas* and (3) the genera at present accepted in the Trypanosomatidae family may be insufficient to encompass its actual diversity".

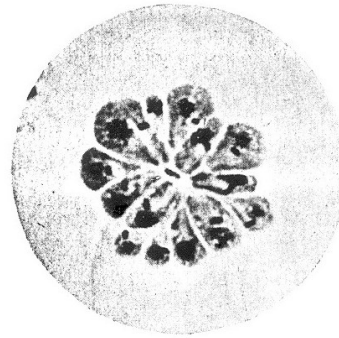
7.4. Trabalhos pioneiros (parte das ilustrações ou do texto)

Novy FG, MacNeal WJ, Torrey HN 1907.
The trypanosomes of mosquitoes and other insects.
J Infect Dis 4: 223-276.

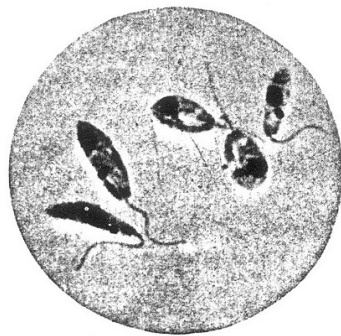
Crithidia fasciculata (formas de cultura)



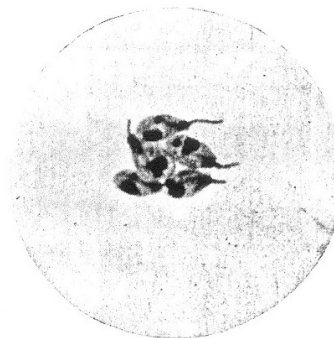
Prancha 8: Fig. 1



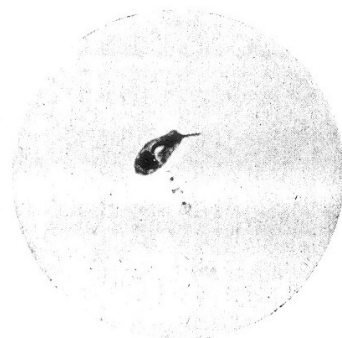
Prancha 8: Fig. 2



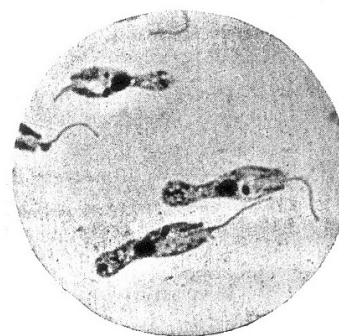
Prancha 8: Fig. 5



Prancha 9: Fig. 1



Prancha 9: Fig. 2



Prancha 9: Fig. 4

Observe:

Haptomonas, geralmente sem flagelo livre (prancha 8: figs 1 e 2); procoanomastigotas e paracoanomastigotas (prancha 8: fig. 5; prancha 9: fig. 1); metacoanomastigota (prancha 9: fig. 1); endocoanomastigota (prancha 9: fig. 2); células tipo "jarro" (prancha 9: fig. 4).

Wenyon CM 1926.

Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists,
vol 1, Baillièrè, Tindall & Cox, London.(p. 363–366): Genus *Herpetomonas* Kent, 1880.

"The genus *Herpetomonas* was created by Kent for a flagellate of the house fly (*Musca domestica*), which was first mentioned by Burnett (1851, 1852) under the name *Bodo*. The next record of the fly flagellate is that of Leidy (1856), who said he had frequently found *Bodo muscarum* in the intestine of the house fly in immense quantity. Later Stein (1878) referred to it as *Cercomonas muscae domesticae*, and gives *Bodo muscae domesticae* (Burnett) as a synonym, though, as noted above, Burnett referred to it only as *Bodo*. Finally, Kent (1880) referred it to his genus, and called it *H. muscae domesticae* (Burnett), though this specific name was really Stein's. It would seem, therefore, as pointed out by Hoare (1924), that the correct name should be *H. muscarum* Leidy, 1856, as there is no doubt that Leidy and Burnett were both observing this flagellate"...

... "In the writer's opinion, the bulk of evidence is in favour of the view that the flagellate of the house fly has a trypanosome stage occasionally, though it is most usually seen in the leptomonas form."...

.. "*Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856). – This flagellate is very common in the intestine of the house fly, *Musca domestica*, in all parts of the world (Figs. 159 and 169). In some localities, specially in the tropics, practically every fly examined is found to be infected. It has been described from a variety of hosts other than *Musca domestica*, but from the work of Chatton and his collaborators (1911–1913) on the parasites of species of *Drosophila*, and that of Patton (1912b) on *Musca nebulosa* and *Lucilia serenissima*, it appeared at one time that the specificity of the insect flagellates for their hosts was greater than has been supposed, and that it was possible that many of the flagellates which had been regarded as *H. muscarum* were in reality distinct species. Patton (1921), however, as a result of further observations, states that he has found this flagellate in Madras in the following hosts: *M. nebulosa*, *M. humilis*, *Fannia canicularis*, *Borborus* sp., *Drosophila* sp., *Lucilia argyricephala*, *L. craggi*, while Becker (1923d) has shown by actual cross-infection experiments that in North America it may infect *Phormia regina*, *Lucilia sericata*, *Calliphora erythrocephala*, *Cochliomyia* (*Chrysomyia*) *macellaria*, *Musca domestica*, and *Sarcophaga bullata*."...

..."As regard the distribution of *H. muscarum* in the fly, it may occur in any part of the gut up to the opening of the proventriculus. In the fully-grown leptomonas form it has a pointed, blade-like body up to 30 microns in length and 2 to 3 microns in breadth. The flagellum is often three times the length of the body. The nucleus is central in position, and the elongated kinetoplast is near the anterior"...

..."A feature of this flagellate, which has given rise to some controversy, is the frequent occurrence of two flagella (Fig. 169). This fact led Prowazek (1904) to define the genus *Herpetomonas* as including biflagellate organisms. The observations of Patton (1908b), Porter (1909b), Mackinson (1910), and the writer (1911a) have clearly shown that the biflagellate individuals, which may comprise the majority of forms seen in an infection are in reality dividing forms (Fig. 159)."...

(p. 335): "...It was proved ... that the forms with two flagella were in reality dividing forms in which precocious flagellum formation had taken place in anticipation of coming division of the flagellate."...

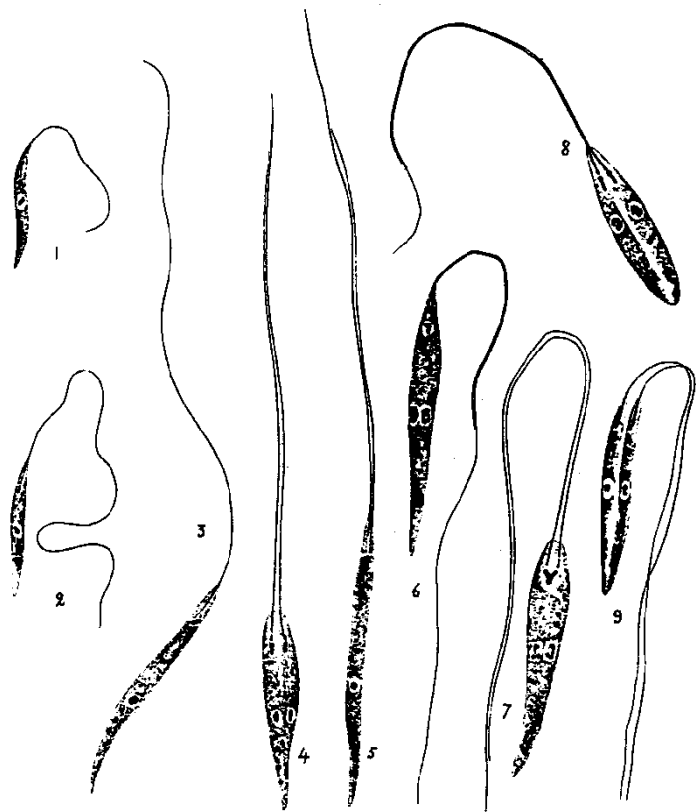


FIG. 169.—*Herpetomonas muscarum* FROM THE INTESTINE OF THE HOUSE FLY, FIXED IN SCHAUDINN'S FLUID AND STAINED WITH IRON HÆMATOXYLIN ($\times 2,000$). (ORIGINAL.)

1-3. Short forms with single flagellum.

4-9. Dividing forms, showing formation of new flagella as new outgrowth and division of kinetoplast and nucleus.

Swellengrebel NH 1911.

Note on the morphology of *Herpetomonas* and *Crithidia*, with some remarks on "physiological degeneration".

Parasitology 4: 108-130.

II. *CRITHIDIA CALLIPHORAE* n. sp.

This species was only found once and so I cannot give a description of the whole life-history. It is certainly different from the *Herpetomonas* also found in the gut of *Calliphora erythrocephala*, but it is possible that this species is identical with *C. muscae-domesticae* (Werner), as described by Rosenbusch (1909).

The full-grown organism is 12-21 μ long (without the flagellum) and 2 μ broad; the whole flagellum is 19-31 μ long, the extracellular part of it measures 15-28 μ . It looks rather like a *Herpetomonas*

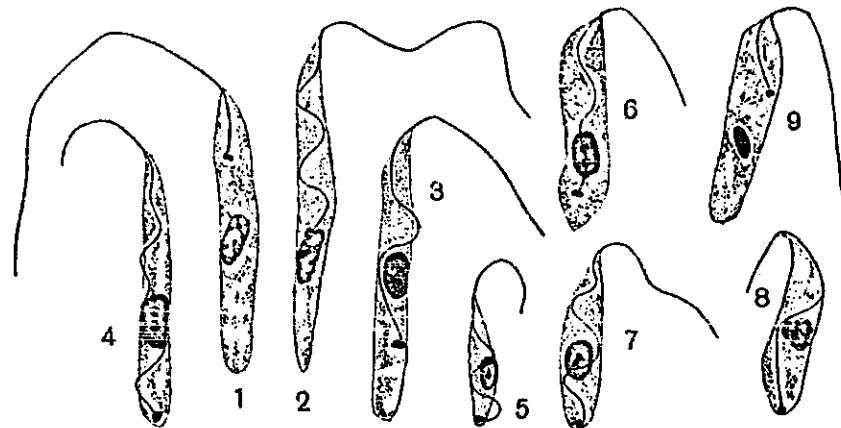


Diagram I. *Crithidia calliphorae*.

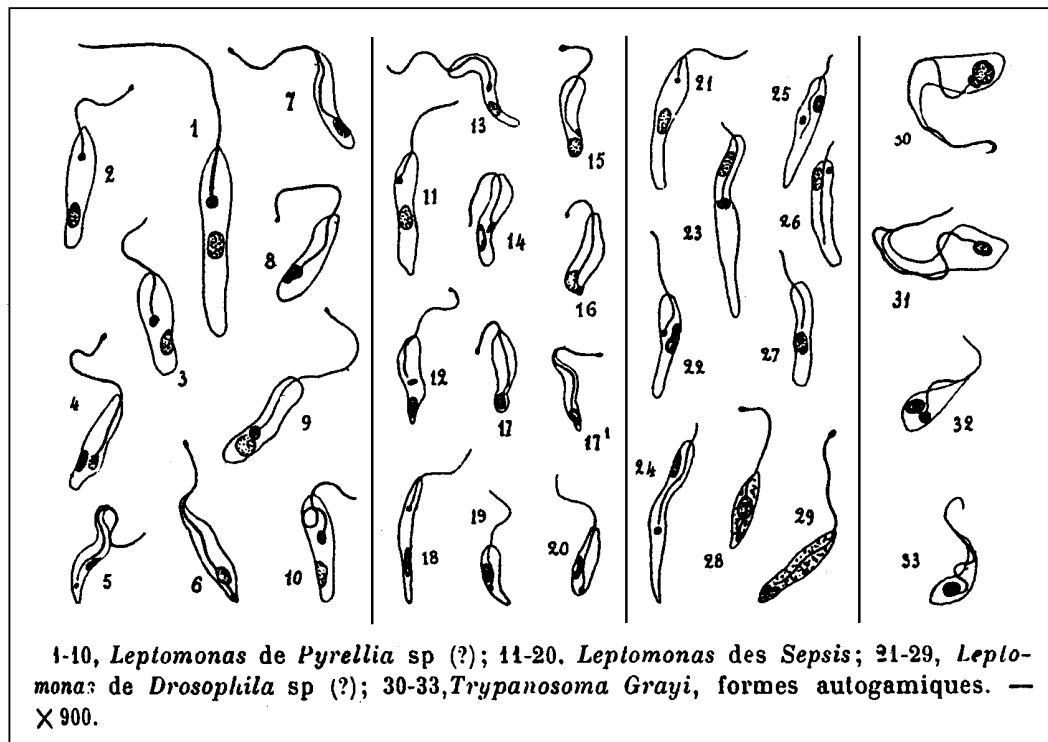
- 1. *Herpetomonas*-form.
- 2. *Crithidia*-form.
- 3-8. Trypanosome-forms.
- 9. *Herpetomonas*-form (wet fixation, iron-haematoxylin).

Figuras 1-9: Promastigotas, paramastigotas e opisthomonadas semelhantes às encontradas em amostras que têm sido identificadas como *Herpetomonas*. Na presente tese, classificadas no grupo H 2.

Roubaud E 1912.

Phénomènes autogamiques et formes trypanosomiennes chez
quelques flagellés de Muscides Africains.

C R Soc Biol 72: 552-554.

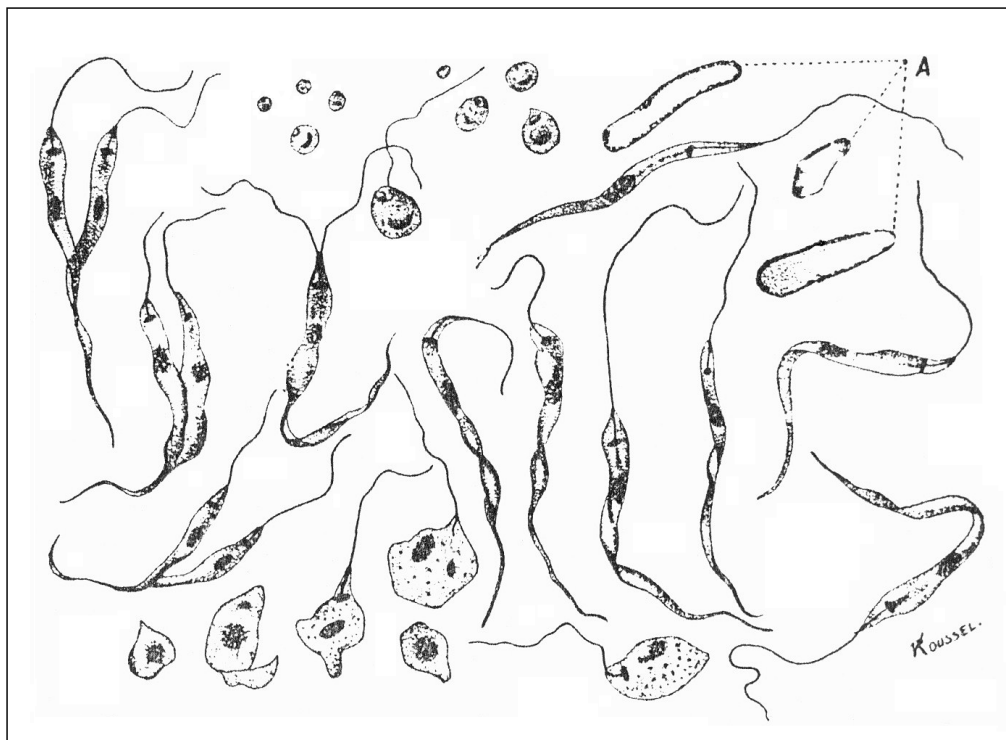


Figuras 1–29: Promastigotas, paramastigotas e opistomastigotas semelhantes às encontradas em amostras que têm sido identificadas como *Herpetomonas*. Na presente tese, classificadas no grupo H 2.

Lafont A 1910.

Sur la présence d'un *Leptomonas*, parasite de la classe des Flagellés,
dans le latex de trois Euphorbiacées.

Ann Inst Pasteur 24: 204-219.



Phytomonas davidi

(A: grãos de amido)

França C 1920.

La flagellose des Euphorbes (II). *Ann Inst Pasteur* 34: 432-465.

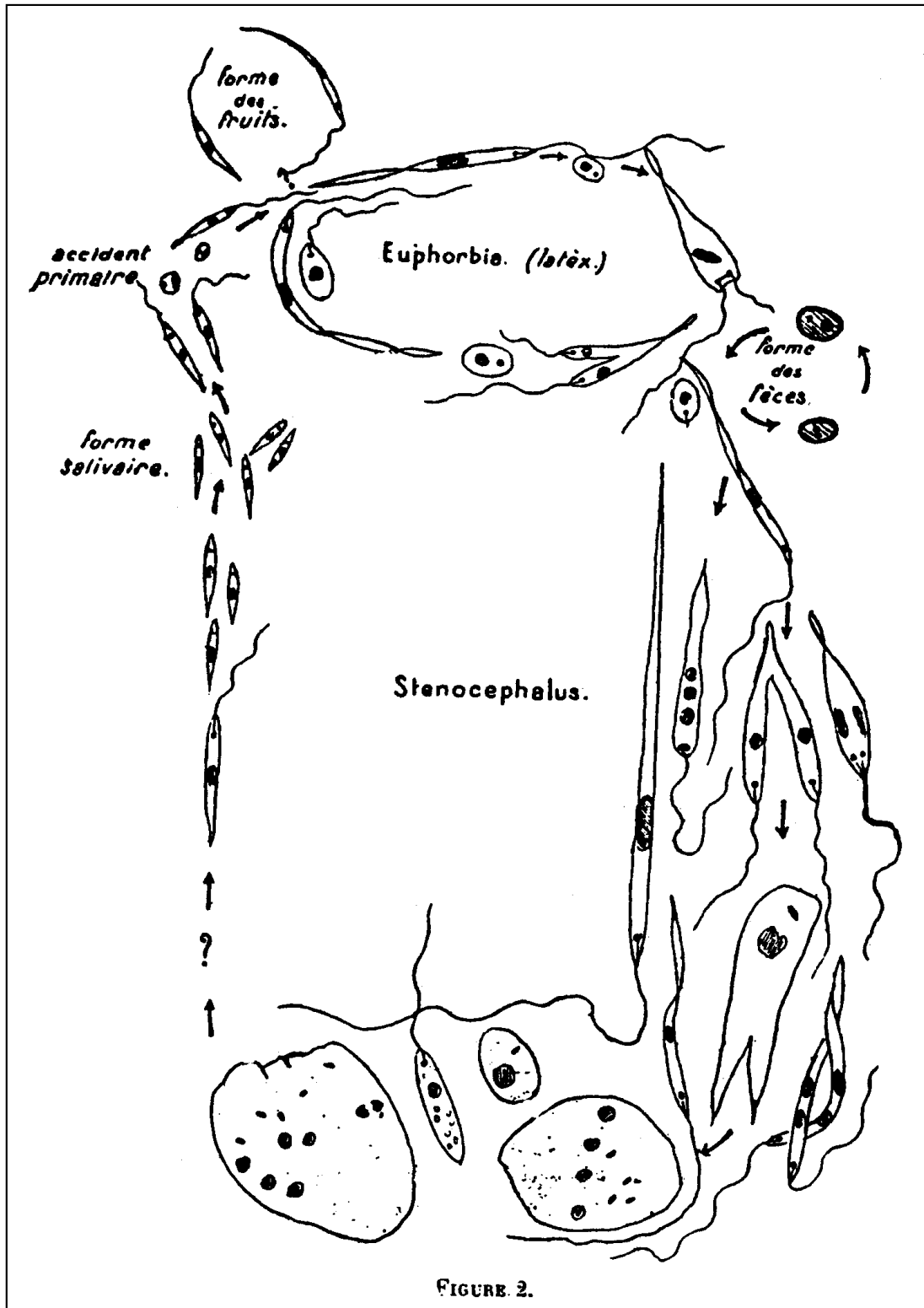


FIGURE 2.

Ciclo evolutivo de *Phytomonas davidi*.

Stahel G 1931.

Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (ploëmnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. Mikroskopische untersuchungen und infektionsversuche.

Phytopathol Z 4: 65-82.

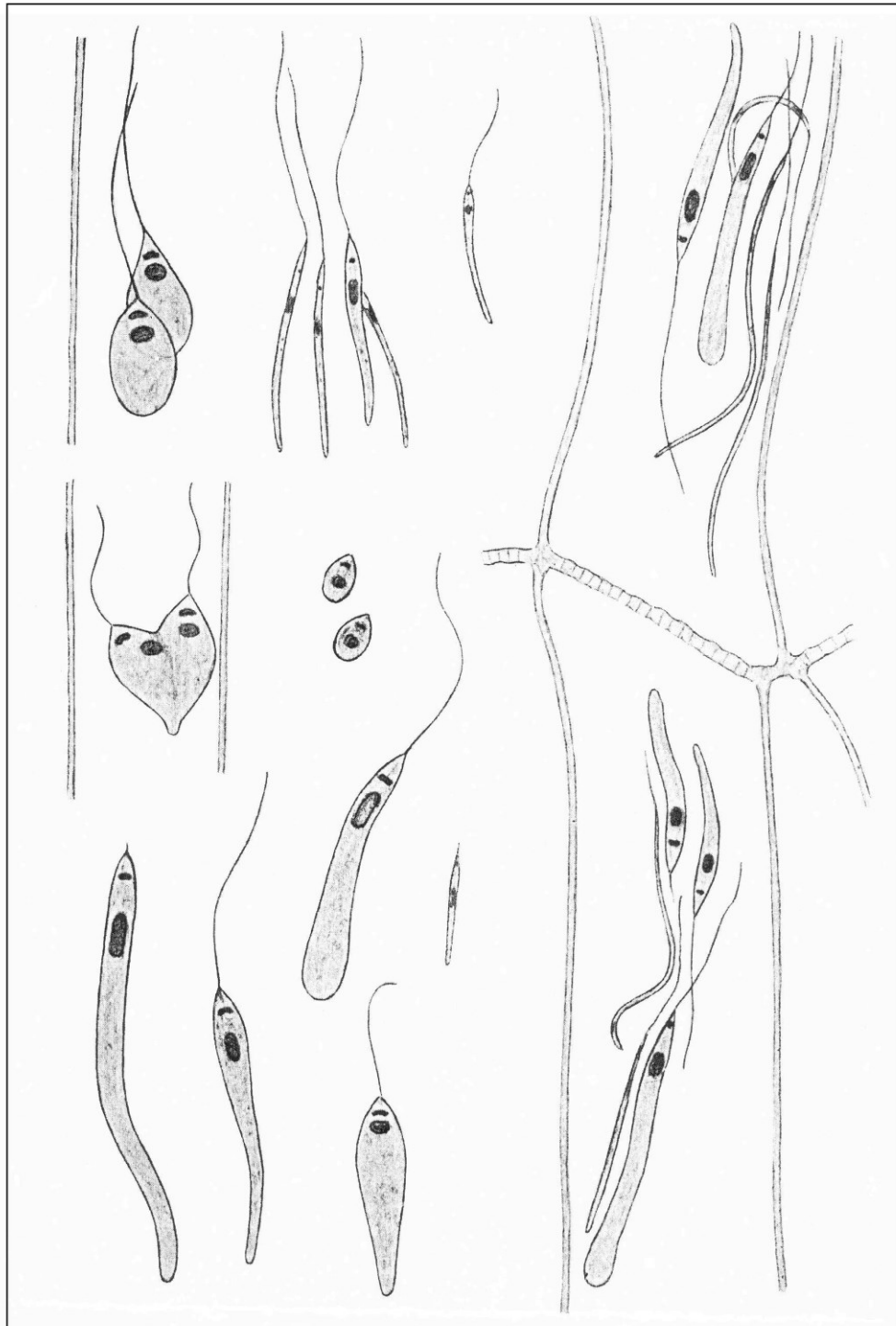


Fig. 8: Diversas formas de *Phytomonas leptovosorum*.
(à direita) vasos com flagelados; (à esquerda) formas longas; (ao centro) formas sem flagelo.