RELACIONES HOSPEDERO-PARÁSITO EN EL CASO DE LOS TOTIVIRUS QUE INFECTAN PROTOZOARIOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

SERGIO ALFREDO VANEGAS ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ

2018

RELACIONES HOSPEDERO-PARÁSITO EN EL CASO DE LOS TOTIVIRUS QUE INFECTAN PROTOZOARIOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

SERGIO ALFREDO VANEGAS ÁLVAREZ

Proyecto de trabajo de grado para optar por el título de licenciado en biología

CARMEN HELENA MORENO DURAN

Directora

MARIA AURORA LONDOÑO AVENDAÑO

Co-directora

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ

2018

La universidad no se hará responsable de las ideas expuestas por los graduandos en el trabajo de grado, según el artículo 117 del acuerdo 029 del consejo superior de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas expedido en junio de 1998

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a mi familia, en especial a mi madre, a Antonio Moreno y a mi hermano por brindarme el apoyo emocional y económico durante todo este proceso de formación, también a la profesora María Aurora Londoño, por su dedicación, tiempo, paciencia, y además por introducirme al mundo de la virología y a la profesora Carmen por el apoyo y sus recomendaciones en esta monografía.

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por la formación que recibí, y me ayudo a crecer académicamente y personalmente. A mis amigos y conocidos que estuvieron presentes en este camino.

MUCHAS GRACIAS

RESUMEN

Los virus de la familia Totiviridae poseen un material genético de RNA bicatenario, infectan a hongos, animales y parásitos protozoos, estos últimos causantes de las enfermedades giardiasis, leishmaniasis y tricomoniasis. Se realizó una revisión bibliográfica de la influencia de los viriones de la familia Totiviridae sobre las patologías causadas de sus hospederos protozoarios. En los virus con transmisión vertical (*Leishmaniavirus* y *Trichomonasvirus*), está presente durante todo el ciclo de vida del parásito debido a que no hay un estadio de quiste, y su presencia hace que se desencadene una respuesta inmune proinflamatoria, a partir del reconocimiento del RNA viral por parte del receptor tipo toll 3 (TLR3), aumentando la virulencia del protozoo; en el caso de leishmaniasis se ha descrito que esto genera cambios sintomatológicos y que incluso altera la respuesta a los tratamientos farmacológicos convencionales. Por el contrario, en los virus con transmisión extracelular (*Giardiavirus*), parece que no hay un cambio en la respuesta inmune sino que cuando hay una mayor infección viral se genera un proceso de enquistamiento del parásito, permitiéndole infectar nuevos hospederos. También se han reportado totivirus en protozoos de interés veterinario como *Eimeria sp*, y además por microscopía electrónica se han reportado partículas similares a las de totivirus en parásitos de seres humanos y plantas; de manera que la asociación de totivirus con protozoos parece estar restringida a aquellos que tienen un estilo de vida parasitaria. Los totivirus generan cambios en la relación hospedero parásito en los protozoos que infectan; esto tiene consecuencias epidemiológicas, y alteración en los tratamientos médicos, de modo que en futuros estudios sobre las enfermedades en las que ya se ha descrito la asociación se debe tener en cuenta la presencia de totivirus en su diagnóstico y tratamiento, mientras que en los que se sospecha la presencia de totivirus y en los que no se ha establecido el rol del virus en la patogenia, se requiere confirmar las características de la asociación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización genómica de Giardiavirus... 20

Figura 2. Filogenia de miembros de la familia Totiviridae junto con la relación de la característica evolutiva con su hospedero. 21

Figura 3. Ciclo viral de los totivirus.. 24

Figura 4. Filogenia de seis super-grupos taxonómicos de eucariota..... 25

Figura 5. Multiplicación de Giardiavirus (GLV) durante el ciclo de vida del hospedero. 27

Figura 6. Organización genómica de las especies de Trichomonasvirus..... 30

Figura 7. Ciclo de vida de Trichomonasvirus: donde se incluye en qué momento ocurre el ciclo viral. 31

Figura 8. Organización genómica de las especies de Leishmaniavirus. 33

Figura 9. Ciclo de vida de Leishmania sp, teniendo en cuenta la presencia de viriones de LVR 35

Figura 10. Organización genómica de Eimeriaviruses 40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la similitud de aminoácidos entre las proteínas CP/RdRp de GLV y las especies de TVV 32

Tabla 2. Relación de los tipos de síntomas de leishmaniasis y la presencia de LVR-1 con las especies de Leishmania encontradas en casos clínicos de Rondonia, Brasil. 37

Tabla 3. Relación entre forma de vida y presencia de totivirus 43

ABREVIATURAS

AfSV1	*Aspergillus foetidus* slow virus 1
AsV,	*Armigeres subalbatus* virus
CmRV	*Coniothyrium minitans* RNA virus
CP	Proteína de la cápside
DmTV	*Drosophila melanogaster* totivirus
dsRNA	doble cadena de RNA
EbRV1	*Eimeria brunetti RNA virus 1*
EsRV1	*Eimeria stiedai virus 1*
EtRV1	*Eimeria tenella RNA virus 1*
GLV	Giardia lamblia virus
HmTV1-17	*Helicobasidium mompa* totivirus 1-17
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IMNV	Infectious myonecrosis virus
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
LC	Leishmaniasis cutánea
LD	Leishmaniasis diseminada
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leismaniasis mucocutanea
LV	Leishmaniasis visceral
LVR	Leishmaniavirus
LVR1-1	Leishmania RNA virus 1-1
LVR2-1	Leishmania RNA virus 2-1
MoV2	*Magnaporthe oryzae* virus 2
ORF	Marcos de lectura abiertos
ORV	Omono River virus
PMCV	Piscine myocarditis virus
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RnVV1	Rosellinia necatrix victorivirus 1

ScV-L-A	*Saccharomyces cerevisiae* virus L-A
ScV-L-BC	*Saccharomyces cerevisiae* virus LBC
SsRV1	*Sphaeropsis sapineav* RNA virus 1
SsRV2	*Sphaeropsis sapinea* RNA virus 2
SsV-L	*Scheffersomyces segobiensis* virus L
TcV1	Tolypocladium cylindrosporum virus 1
TiTV,	Tianjin totivirus
TOSV	Virus de la toscana
TVV	Trichomonasvirus
TVV1	Trichomonas vaginalis virus 1
TVV2	Trichomonas vaginalis virus 2
TVV3	Trichomonas vaginalis virus 3
TVV4	Trichomonas vaginalis virus 4
UTR	Sitios sin traducir
VLP	Particulares similares a virus
XdV-L1A	*Xanthophyllomyces dendrorhous* virus L1A
XdV-L1B	*Xanthophyllomyces dendrorhous* virus L1B

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN **12**

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **14**

3. HIPOTESIS **16**

4. OBJETIVOS **17**

5. METODOLOGÍA **18**

5.1 Tipo de estudio *18*

5.2 Recolección y selección de datos *18*

5.3 Análisis de la información *19*

6. CAPÍTULO 1: FAMILIA TOTIVIRIDAE Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DE VIDA DE LOS EXCAVADOS **20**

6.1. Características de la familia Totiviridae *20*

6.2 Características de los protozoos Excavata *24*

6.3 Giardiavirus *26*

6.4 Trichomonasvirus *28*

6.5 Leishmaniavirus *33*

6.6 Generalidades de totivirus en protozoos de interés veterinario. *38*

7. CAPÍTULO 2: RELACIÓN ENTRE PATOGENICIDAD DEL PARÁSITO Y LA PRESENCIA DE TOTIVIRUS **41**

7.1. Distribución de totivirus en Excavata y Alveolata patógenos y no patógenos *41*

7.2. Interacciones virus-protozoo que modifican la patogenicidad de euglenozoos *48*

7.3.1. Patogenicidad de *T. vaginalis* 51

6.3.2. Patogenia de *Giardia duodenalis* 54

8 CONCLUSIONES **57**

9. REFERENCIAS **59**

1. INTRODUCCIÓN

Los virus mantienen una estrecha relación con las formas celulares de las que dependen para multiplicar su material genético y dispersarse. Además de la capacidad de manipulación del metabolismo celular, los virus hacen aportes significativos a la estructura genética de sus hospederos (Koonin et al. 2015, Liu et al. 2011).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) la familia Totiviridae está conformada por los géneros *Giardiavirus,* (GLV) *Leishmaniavirus* (LRV) y *Tricomonasvirus* (TVV) que son los que infectan a protozoarios y los géneros *Totivirus* y *Victovirus* que infectan a hongos de diferentes grupos, incluyendo levaduras, hongos fitopatógenos y dermato-patógenos humanos (Wickner et al 2012). Los virus de esta familia se caracterizan por: (1) virión en forma de icosaedro, (2) tamaño de 20 a 40 nm de diámetro, y (3) genomas monosegmentados de doble cadena de RNA (dsRNA) que codifican marcos de lectura abiertos, el de la proteína de la cápside (CP) y una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). (Banik et al 2014, Goodman et al 2011). Los totivirus que infectan protozoos lo hacen exclusivamente en parásitos cuyo ciclo de vida puede tener un vector como en el caso de *Leishmania sp*, también pueden transmitirse de forma directa como *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, y *Eimeria* sp.

Los protozoarios se pueden definir como organismos unicelulares eucariotas (López y Serrano 2005), ya que son un grupo bastante heterogéneo en su morfología celular, forma de vida, y ambientes que han colonizado. El super grupo taxonómico de los eucariotas Excavata, que corresponde a protistas con él orgánulo locomotor flagelado, está compuesto por organismo con

diversos ciclos de vida (parásitos y de vida libre) y estrategias metabólicas (autótrofas y heterótrofas), sin embargo aún se discute si es un grupo monofilético (Hampl et al 2009, Dawson y Paredes 2013).

Teniendo en cuenta estos datos es necesario realizar un acercamiento a la relación que hay entre totivirus y sus hospederos parásitos protozoos desde una perspectiva molecular, médica, taxonómica ecológica y evolutiva. En esta monografía se hará la descripción analítica del vínculo entre el virus de la familia Totiviridae y excavados de interés médico a partir de una investigación documental.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Describir el efecto que causan los virus totivirus sobre sus hospederos, principalmente aquellos que poseen un interés médico como los hongos y los protozoos parásitos es importante porque ayuda a entender los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos y a la vez explica cómo ha sido la evolución de la familia Totiviridae y porqué tiene un rango de hospedadores tan amplio.

Los detalles moleculares de la interacción entre los viriones de la familia Totiviridae con sus hospederos, específicamente los protozoos parásitos, puede generar un acercamiento al mecanismo de patogenia que da origen a la giardiasis, la leishmaniosis y la tricomoniasis. Ya que la prevalencia de giardiasis en Colombia se estima en 12% (Corredor y Arciniegas, 2000), la prevalencia de leishmaniosis en Colombia es de 33,6 casos por cada 100.00 habitantes según el informe de Organización Mundial de la Salud (2017) y la de tricomoniasis fue de 0,8% en un estudio realizado en mujeres fértiles de la ciudad de Bogotá (Muller et al 2010). Entender la relación de los totivirus con las manifestaciones clínicas que tienen estas infecciones parasitarias puede ayudar a plantear nuevos diagnósticos y tratamientos para estas enfermedades frecuentes en la población colombiana.

La familia Totiviridae está conformada por virus que infectan eucariotas de varios grupos taxonómicos, incluyendo parásitos protozoos, hongos, plantas y animales. Los protozoos que se conocen como hospederos de totivirus causan enfermedad a los seres humanos y parece haber una relación entre la presencia de totivirus y la virulencia del protozoo, no obstante, puede haber un sesgo en esta observación debido a que cada uno de estos parásitos es el más estudiado dentro del

grupo taxonómico al que pertenece. Por consiguiente, la propuesta de esta monografía abarca las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es la relación de la familia Totiviridae con protozoos que no son parásitos y/o que no infectan humanos?

¿Qué rol cumple el virus en el ciclo biológico y el estilo de vida de su hospedero?

¿Cuál es la maquinaria molecular que tiene el parásito protozoo para mantener la relación viral?

3. HIPOTESIS

La asociación de los virus de la familia Totiviridae con protozoos puede darse en microorganismos que poseen diversos estilos de vida.

Los virus de la familia Totiviridae generan una modificación en el ciclo de vida del hospedero protozoo que infectan y esto puede causar una alteración en la patología que éste causa.

La maquinaria molecular que se activa durante la interacción totivirus-protozoo, hace que la relación posea beneficios para ambos organismos.

4. OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica de la influencia de los virus de la familia Totiviridae sobre sus hospederos protozoarios.

Evidenciar la relación entre la patogenicidad y la presencia del virus, particularmente en protozoarios con interés médico, mediante tablas comparativas e interpretaciones filogenéticas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio

Este estudio está en el marco de una investigación documentada, definido por Morales (2003) como el proceso científico de recolección, organización, análisis e interpretación de la información alrededor de un tema determinado, que genera la construcción de un conocimiento, por lo tanto el resultado de esta investigación generará una monografía de compilación. Desde esta perspectiva esta investigación se divide en dos momentos: recolección y selección de datos, y análisis de la información.

5.2 Recolección y selección de datos

La recolección de información bibliográfica se realizará teniendo en cuenta, artículos científicos, libros, encontrados en las bases de datos, BMC, journal of virology, PLOS, PMC, PNAS, revistas del consorcio ScienceDirect y de la red Scielo. La localización de los artículos se hará a partir del buscador de NCBI y google académico. Debido a la amplitud del tema solo se tendrán en cuenta publicaciones del año 1990 hasta abril del 2018 y que posean una perspectiva molecular, médica, evolutiva, taxonómica y bioinformática sobre:

- Ciclo viral de los miembros de GLV, LVR y TVV
- Ciclo de vida de los protozoos del supergrupo Excavata que infectan humanos y tienen totivirus
- Historia evolutiva de la familia Totiviridae y de los parásitos protozoos que infectan
- Características del RNA y las proteínas de totivirus y sus interacciones moleculares

La información molecular (secuencia de nucleótidos y proteínas) fue tomada de la bases de datos GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) y Pfam (https://pfam.xfam.org/) disponible hasta abril de 2018.

5.3 Análisis de la información

En esta etapa se procede a la lectura, organización y selección de información bibliográfica, donde se sintetizan y analizan los hallazgos relevantes para conceptualizar las características de la relación totivirus-protozoo.

La información molecular se utilizó para medir similitud entre secuencias de proteínas mediante alineamientos en EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/), como es sugerido por el ICTV para medir porcentajes de similitud entre secuencias de virus de la familia Totiviridae.

En otro aspecto y usando la información molecular recolectada, se realizó una filogenia en el software MEGA 7.0, para hacer los análisis filogenéticos y que ayudan a comprender la relación del virus con la patogenicidad del protozoo parásito.

A partir de los datos recolectados y análisis realizados la monografía se divide en dos capítulos:

- Revisión sistemática de la ocurrencia de totivirus en miembros del supergrupo Excavata y su relación con el ciclo de vida
- Mecanismos moleculares que podrían explicar la relación entre patogenicidad del parásito y la presencia de totivirus

6. CAPÍTULO 1: FAMILIA TOTIVIRIDAE Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DE VIDA DE LOS EXCAVADOS

6.1. Características de la familia Totiviridae

Los viriones de la familia Totiviridae tienen forma de icosaedro, no poseen moléculas de carbohidratos y lípidos (Wickneret al 2012), son isométricos con un tamaño de 20 a 40 nm, el genoma es monosegmentario de dsRNA lineal con un tamaño de 4,6 a 7 mil pares de bases , codificano dos marcos de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), el de la CP y el otro para una RdRp, rodeado por dos regiones no traducidas (UTR por sus siglas en inglés) en los extremos, 5'UTR y 3' UTR. (Wickner et al 2012). La proteína RdRp es una proteína estructural que viene encapsulada dentro del virión unida a la molécula de dsRNA (Ver Fig. 1 como ejemplo típico).

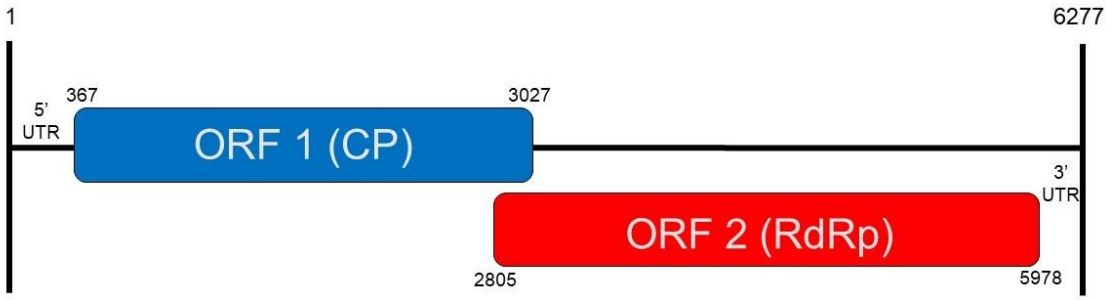


Figura 1. Organización genómica de Giardiavirus. Comprende por 6277 pares de ribonucleótidos, que codifican 2 marcos de lectura abiertos (ORF), ORF 1 proteína de la cápside, ORF 2 RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). UTR = extremos no traducidos 5´ y 3´, respectivamente. Basado en la secuencia del GenBank NC_003555.1.

Para la familia Totiviridae se han reportado cinco géneros según el ICTV, de los cuales tres, *G*LV, LVR y TVV, se hospedan en protozoos parásitos (Goodman et al 2011a) y los otros dos (*Totivirus* y *Victovirus*) infectan a hongos (Wickner et al 2012) como es evidenciado en la tabla 1. Los del género *Totivirus* infectan especies de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*, y el género *Victovirus* infecta a diferentes especies de hongos multicelulares como *Aspergillus foetidus y Sphaeropsis sapinea* (Wickner et al 2012). Adicionalmente en los últimos años se han clasificado tentativamente nuevas especies a la familia Totiviridae, incluyendo una que infecta protozoos parásitos de vertebrados (*Eimeria brunetti RNA virus*), (Wu et al 2016), virus de artrópodos (*Armigeres subalbatus totivirus,* Zhai et al. 2010), de peces (*Piscine myocarditis virus)*, (Haugland et al 2011), y de murciélagos (*Tianjin totivirus*, Yang et al. 2012).

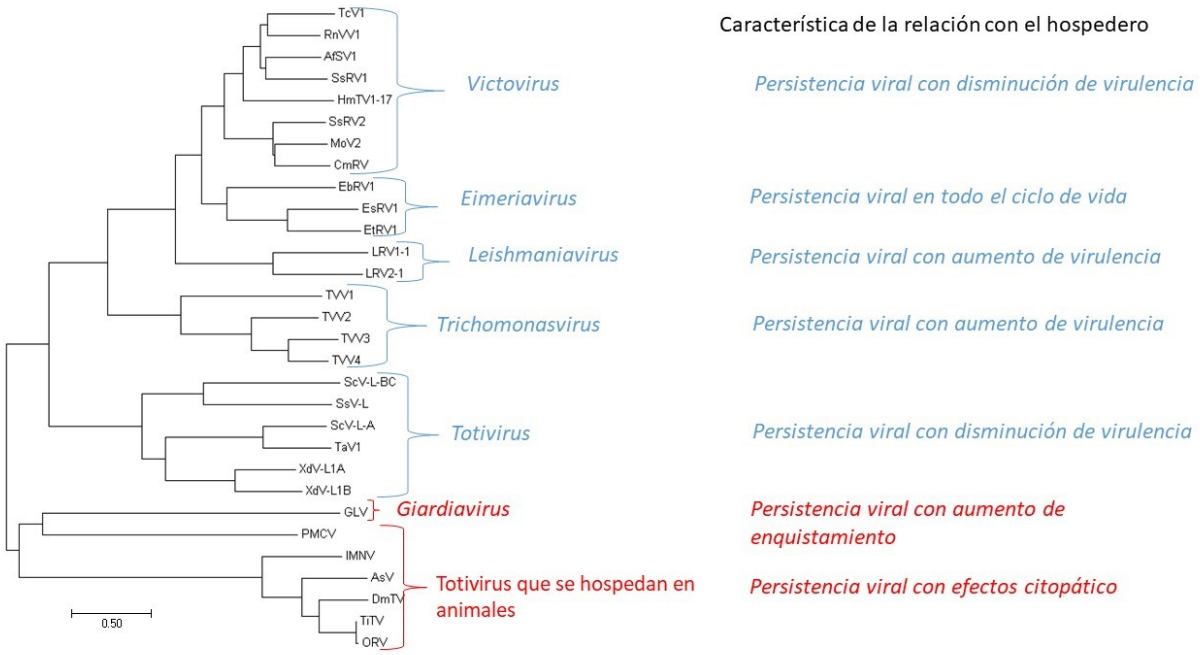


Figura 2. Filogenia de miembros de la familia Totiviridae junto con la relación de la característica evolutiva con su hospedero. Esta filogenia fue realizada con un modelo neighbor-joining, a partir de un alineamiento MUSCLE con las secuencias de la CP y la RdRp de cada virus, como es descrito en la sección de metodología- La filogenia se realizó

con las especies de totivirus que están aprobadas por el ICTV más por otras se han clasificado tentativamente debido a sus características moleculares y filogenéticas similares a las virus de esta familia. *EbRV1,* Eimeria brunetti RNA virus 1; *EsRV1,* Eimeria stiedai virus 1; *EtRV1,* Eimeria tenella RNA virus 1; *GLV*, Giardia lamblia virus; *LVR1-1*, Leishmania RNA virus 1-1; *LVR2-1*, Leishmania RNA virus 2-1; *TVV1*, Trichomonas vaginalis virus 1; *TVV2*, Trichomonas vaginalis virus 2; *TVV3,* Trichomonas vaginalis virus 3; *TVV4,* Trichomonas vaginalis virus 4; *TcV1,* Tolypocladium cylindrosporum *virus 1*; *RnVV1*, Rosellinia necatrix *victorivirus 1*; *AfSV1,* Aspergillus foetidus *slow virus 1*; *SsRV1,* Sphaeropsis sapinea *RNA virus 1; HmTV1-17,* Helicobasidium mompa *totivirus 1-17; SsRV2,* Sphaeropsis sapinea *RNA virus 2; MoV2,* Magnaporthe oryzae *virus 2; CmRV, Coniothyrium minitans RNA virus; ScV-L-BC,* Saccharomyces cerevisiae *virus LBC*; *ScV-L-A* Saccharomyces cerevisiae *virus L-A; SsV-L,* Scheffersomyces segobiensis *virus L; TaV1,* Tuber aestivum *virus 1; XdV-L1A,* Xanthophyllomyces dendrorhous *virus L1A; XdV-L1B,* Xanthophyllomyces dendrorhous *virus L1B; PMCV, piscine myocarditis virus; IMNV, infectious myonecrosis virus; AsV,* Armigeres subalbatu*s virus; DmTV,* Drosophila melanogaster *totivirus; TiTV, Tianjin totivirus; ORV, Omono River virus.*

Como criterios para reportar un nuevo género de la familia Totiviridae, se tiene en cuenta cuando se trata de un nuevo hospedero, y que el análisis filogenéticos de las proteínas CP y RdRp, demuestren una separación con respecto a los géneros ya establecidos. (Wu et al 2015, Goodman et al 2011a) Para clasificar nuevas especies dentro de los géneros se analizan los porcentajes de similitud de las de secuencias de aminoácidos de la CP y la RdRp, y esto deben ser menor a 50% con respecto a las especies ya reportadas dentro del género y recientemente también se revisa la similitud las secuencias de ribonucleótidos del extremo 5'UTR. (Wickner et al 2012, Goodman et al 2011b, Nibert et al 2012).

Los viriones de la familia Totiviridae se multiplican sin ruptura de la célula hospedera, es decir, a través de un ciclo no lítico. La perpetuación del virus se garantiza repartiendo la progenie viral en las células descendientes durante la división celular y la esporogénesis. Una excepción son los GLV's que sí liberan partículas virales al ambiente extracelular, las cuales están en capacidad de infectar a células de *Giardia lamblia* previamente libres de virus.

El ciclo viral evidenciado en la figura 3 empieza tras la entrada del virión a la célula nueva o en su defecto alguna señal asociada al ciclo celular que indica la des-encapsidación del genoma de dsRNA y la proteína RdRp en el citoplasma; la RdRp se requiere para hacer una transcripción inicial que genera moléculas de RNA en orientación de 3' a 5' utilizables por el ribosoma para sintetizar las proteínas CP y más moléculas de RdRp en forma de un mRNA fusionado del que luego se traducen las dos proteínas por separado tras un salto del mismo ribosoma. Estas moléculas de RNA 3'-5' funcionan como mRNAs al tener en su extremo 5' UTR la estructura secundaria apropiada que debe ser reconocida por la subunidad 40S ribosomal y que se conoce conocida como sitio interno de entrada del ribosoma (IRES). Las RdRp recién sintetizadas se utilizan para hacer copias de las moléculas de dsRNA inicial y terminan unidas a la molécula que sintetizan, listas para ser empaquetadas dentro de las cápsulas que se forman con las proteínas CP junto con las nuevas copias de dsRNA. Únicamente se conoce la liberación del virión en *Giardiavirus*, por medio de exocitosis y posterior pérdida de restos lipídicos. (Li, Wang y Wang. 2001, Goodman et al 2011a, Goodman et al 2011b, Fraga 2012, Maga, Widmer y LeBowitz, 1995).

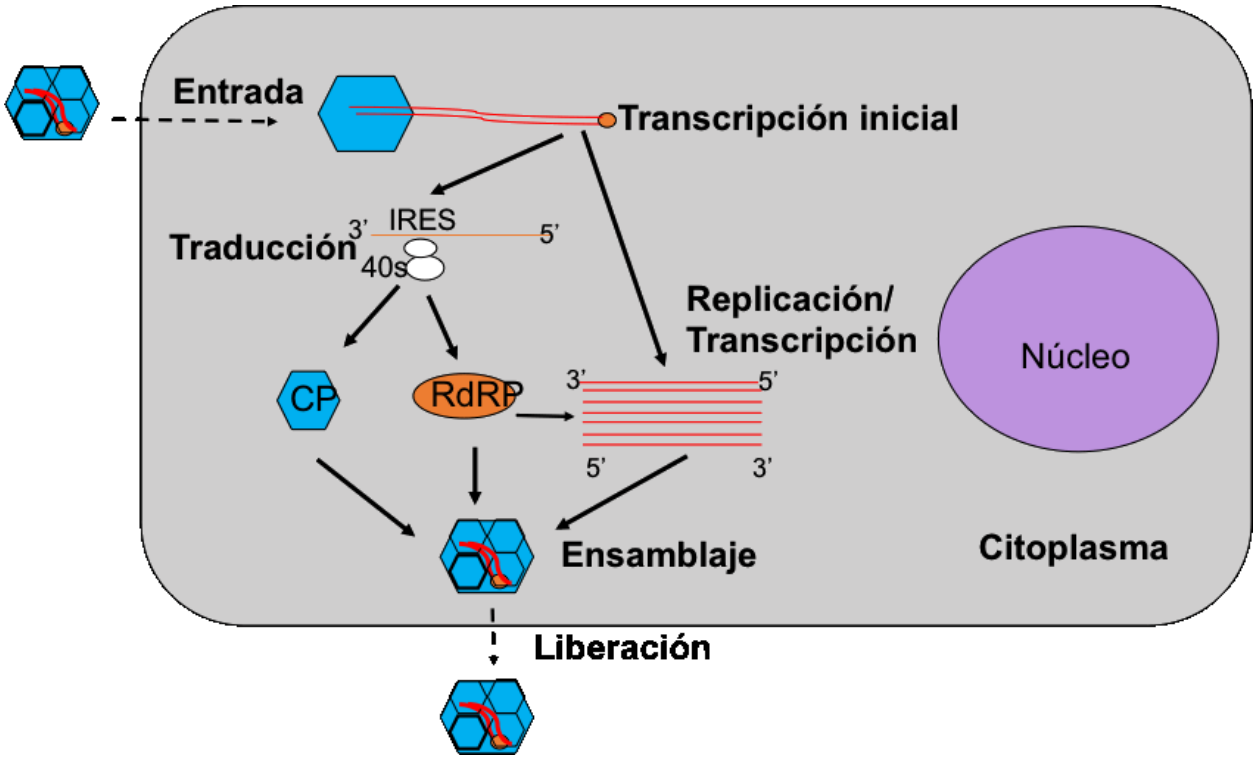


Figura 3. Ciclo viral de los totivirus. Las flechas discontinuas indican que los pasos de entrada y liberación sólo ocurren en las especies que tienen transmisión exógena frecuente. Proteína de la cápside (CP), RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), sitios internos de entrada del ribosoma (IRES).

6.2 Características de los protozoos Excavata

Los excavados son un grupo taxonómico al que pertenecen un gran grupo de protistas que se caracterizan por tener un orgánulo locomotor en forma de flagelo. Actualmente se discute si el grupo es monofilético debido a que sus ciclos de vida y morfología celular no son homogéneos (Hampl et al 2009, Dawson y Paredes 2013). Estudios realizados para comprender las relaciones evolutivas en el grupo han encontrado dos linajes o subgrupos: discoba y metamónada (Hampl et al (2009) (Ver figura 4).

El linaje discoba es un grupo bastante diverso que se subdivide en cuatro grupos: discoba-jakobida, euglenozoa, heterolobosea y tsukubamonadida. Su principal característica es que poseen una mitocondria competente para generar respiración celular (Simpson, Inagaki y Roger 2006, Fu et al 2014). En el grupo euglenozoa se encuentran las especies del género *Leishmania,* las cuales se consideran un grupo monofilético con *Trypanosoma spp.*, que es otro parásito de humanos, de acuerdo con los análisis evolutivos basados en secuencias de genes que codifican factores de elongación como EFL y EF-1α, presentes en la mayoría de eucariotas (Gile et al 2009, Simpson et al 2006). Llama la atención que hasta ahora no se hayan descrito totivirus en miembros del género *Trypanosoma.*

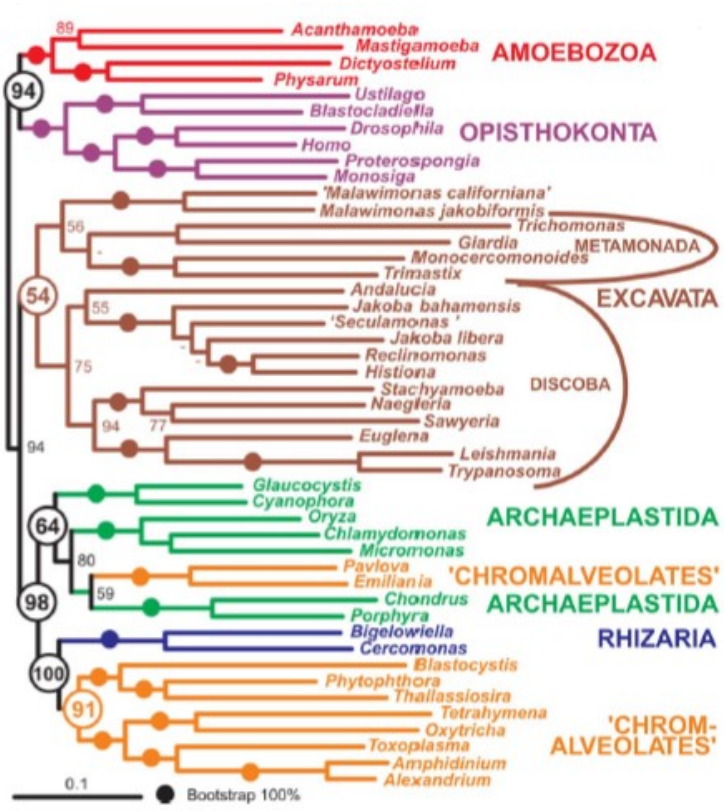


Figura 4. Filogenia de seis super-grupos taxonómicos de eucariota. Realizado a partir de un conjunto de 143 genes en alineamiento concatenado. Se usaron modelos de eliminación de ramas largas a partir de un análisis de 100 replicaciones de bootstrap. Se indican los clados de Excavata (Discoba y Metamonada) (Tomado de Hampl et al (2009).

Los miembros del linaje metamónada son anaerobios o microaerófilos sin mitocondrias clásicas (Hampl et al 2009). Aquí pertenecen las especies de los géneros *Trichomonas* y *Giardia,* las cuales comparten similitudes en los genes que codifican para enzimas involucradas en la vía de arginina deaminasa usada por estos parásitos para obtener energía degradando la arginina que obtienen del hospedero humano (Novák et al 2016).

6.3 Giardiavirus

En este género se conoce una única especie, *Giardia lamblia virus* GLV, cuyo virión mide 36 nm aproximadamente, posee un genoma de dsRNA de 6277 ribonucleótidos, con dos ORFs que se solapan (figura 1). El virus es transmitido de manera extracelular en el estadio de trofozoito, brindando una oportunidad de entrada a través de un receptor en la membrana celular que aún es desconocida, proporcionando una entrada por medio de endocitosis. Como se entiende para otras virosis, tras la endocitosis deben formarse endosomas que transportan el virus a través del citoplasma (Banik et al 2014, Janssen et al 2015, Rivero et al 2013) hasta la región de retículo endoplasmático, cerca del núcleo, donde empieza la traducción de las proteínas CP y RdRp.

El ciclo de vida de *Giardia duodenales* es directo (Figura 5) teniendo al ser humano como único hospedador. La infección se transmite cuando se ingieren los quistes sin GLV, ya sea del agua o de alimentos contaminados, aunque también hay casos de transmisión persona a persona a través del contacto sexual, y por medio de contacto con animales domésticos (Herrera 2005). En el intestino precisamente en la parte del duodeno, la cubierta del quiste se disuelve dejando libre la forma vegetativa, conocida como trofozoito móvil (Cotton et al 2014); es en este estadio que se han encontrado los viriones de GLV, los cuales entran por medio de endocitosis al trofozoito, y por medio de exocitosis salen de la célula (Figura 5). (Wang Wang 1991, Janssen et al 2015, Banik

et al 2014 y Wickneret al 2012). El trofozoito se reproduce asexualmente por medio de fisión binaria longitudinal en el epitelio intestinal y a medida que avanza hacia el colon se va transformando en quiste, que sale al exterior por medio de las heces (Lujan 2006.); el proceso de enquistación involucra la disminución de los procesos metabólicos, y estos frenan la replicación del virus, obligando a los viriones a salir por medio de exocitosis y quedan expuestos a los luz intestinal o salir directamente por las heces.

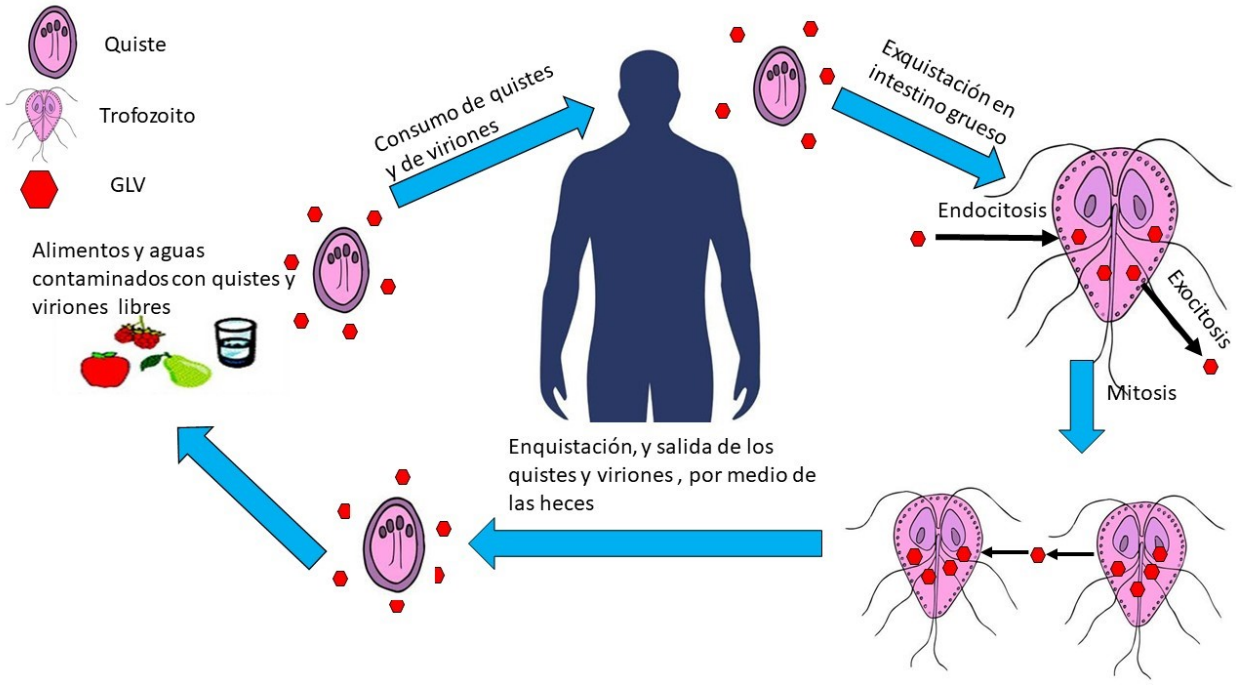


Figura 5. Multiplicación de Giardiavirus (GLV) durante el ciclo de vida del hospedero.

Se reconoce un receptor específico en la membrana celular de *Giardia lamblia* que ayuda a la entrada de GLV (Sepp, et al 1994), y que tendría interacciones con regiones aún no localizadas de la cápside (Janssen et al 2015, Wang Wang 1994). Se sabe que una cantidad alta de partículas virales (superior a 50000) disminuye la capacidad del trofozoito para adherirse al tubo del cultivo y las células que no están adheridas no se dividen y pueden entrar al proceso de enquistamiento (Wang Wang 1991). Esto implica una relación del ciclo de vida de *Giardia lamblia* con GLV

(figura 5), en la que una mayor cantidad de viriones puede generar un enquistamiento, otorgando a *Giardia lamblia* la posibilidad de invadir nuevos hospederos a la vez que los viriones también tendrían posibilidad de salir igual que los quistes o invadir otros trofozoitos en el humano.

Es importante resaltar que la especie *Giardia duodenalis*, posee un problema en su clasificación taxonómica, debido a que posee sinónimos como *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis* pero estos nombres solo se usan cuando es aislado del ser humano, sin embargo, *Giardia duodenalis* parasita varias especies de mamíferos que van desde roedores hasta felinos. Además el género *Giardia* comprende otras 10 especies que infectan a vertebrados, entre ellas *Giardia agilis* en anfibios, *Giardia ardae* en aves, *Giardia canis* en caninos (Thompson Monis 2011). En *Giardia canis* se reportaron viriones que fueron nombrados Giardia canis virus (Cao et al 2009), pero presentan una similitud de un 99% en el genoma con GLV, es decir que los viriones encontrados de *Giardia canis* son de la especie GLV, y además el aislado inicial de donde se obtuvieron estos viriones podría ser de *Giardia lamblia.* (Chen et al 2007, Cao et al 2009).

6.4 Trichomonasvirus

Trichomonasvirus (TVV) es un género que se clasificó recientemente (Goodman et al 2011a), conformado por cuatro especies: *Trichomonas vaginalis virus 1* (TVV1), *Trichomonas vaginalis virus 2* (TVV2) y *TrIchomonas vaginalis 3 (*TVV3), *Trichomonas vaginalis 4* (TVV4) tienen un genoma que oscila entre 4666 a 4950 nucleótidos (Goodman et al 2011a, Goodman et al 2011b). Todas codifican los dos ORF característicos de los totivirus (figura 6) y al igual que en los otros géneros de la familia Totiviridae, la RdRp se expresa desde un mRNA de fusión en el que el ribosoma cambia de un ORF al otro saltando siete ribonucleótidos (Goodman et al 2011[a],

Goodman et al 2011b, Fraga 2012). Las especies de *Trichomonas virus* presentan una similitud en secuencias de aminoácidos de CP/RdRp como sigue: TVV1 con TVV2 de 26%, TVV1 con TVV3 de 24% a 27%, TVV1 con TVV4 de 27%, TVV2 respecto a TVV3 de 38%, TVV2 con TVV4 de 44% y TVV3 con TVV4 de 47%. (Goodman et al 2011a, Goodman et al 2011b).

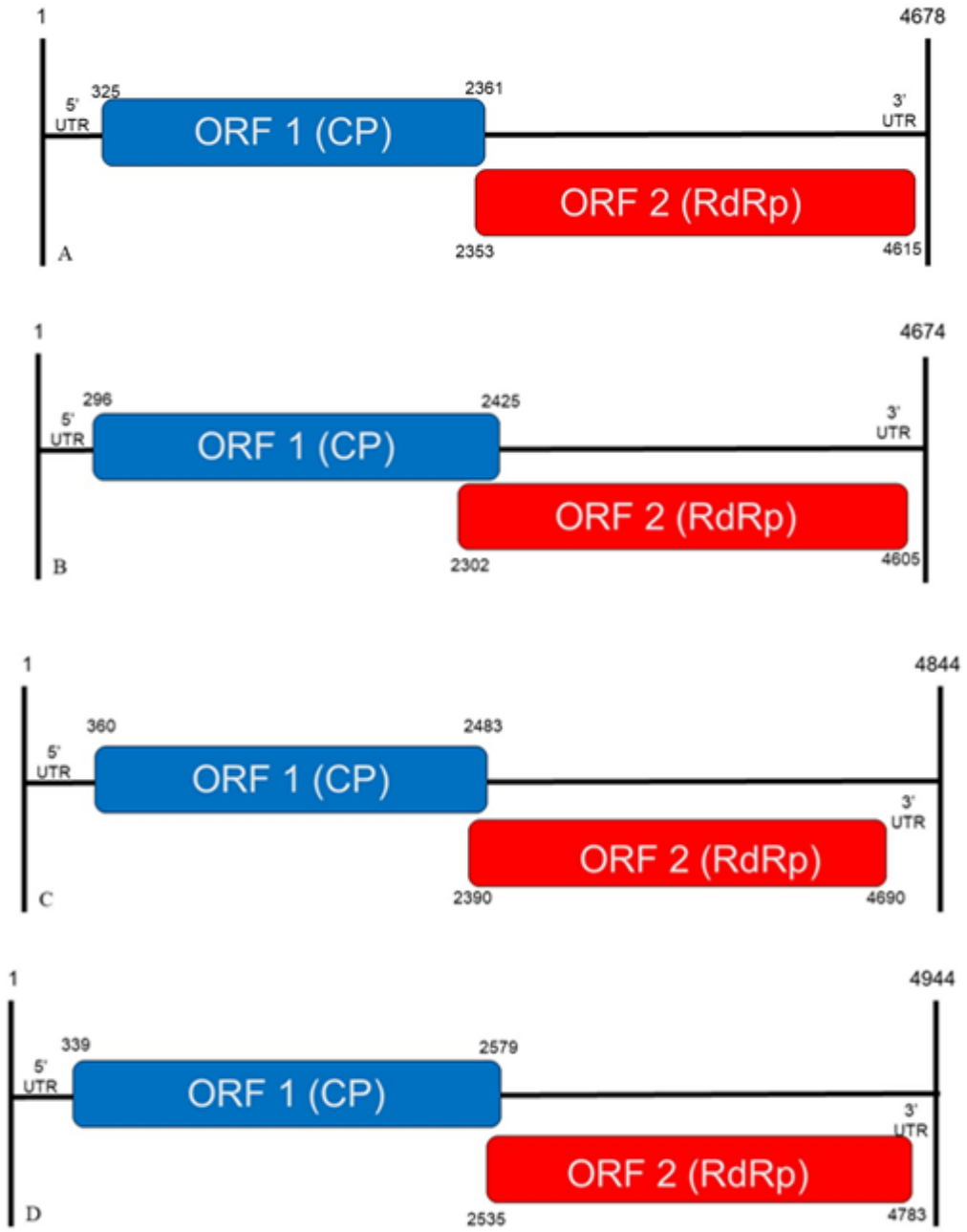


Figura 6. Organización genómica de las especies de Trichomonasvirus. A) TVV1, basado en la secuencia del NCBI HQ607516.1. B) TVV2, basado en la secuencia del NCBI AF127178.1. C) TVV3, basado en la secuencia del NCBI AF325840.1. D) TVV4, basado en la secuencia del NCBI HQ607520. CP = proteína de la cápside, RdRp = polimerasa dependiente de RNA, UTR = sitios no traducidos.

El ciclo de vida del parásito ocurre en el tracto genital femenino y en la próstata, uretra y epidídimo en los hombres, donde se replica por división binaria, manteniéndose en su estadio de trofozoito, aunque se reconoce que en condiciones desfavorables guarda su flagelos (figura 5); El hombre es el único hospedero natural conocido y la infección se da por medio de transmisión sexual (Fraga 2012, Santos 2013). Por el momento el método de propagación conocido de TVV es a partir de transferencia vertical, que ocurre cuando *T. vaginalis* se reproduce por división binaria longitudinal y además esto genera una repartición asimétrica de los viriones **(ver Figura 7)** (Goodman et al 2011a, Goodman et al 2011b, Fraga 2012). La prevalencia de TVV en muestras clínicas de *T. vaginalis,* en una población de 22 aislados en Kenia, fue de 43,5%, en donde el TVV1 tuvo una mayor prevalencia (39,1%), seguido de TVV2 (26,1%), TVV3 (17,4%) y TVV4 (13.0%), y se presentaron muestras con infección de tres especies de TVV (Mascha et al 2017). En base a esta información y a partir del ciclo de vida de *T. vaginalis*, se podría decir que en el protozoo se pueden dar procesos de especiación viral que llevan a la ocurrencia de linajes divergente de TVV en la misma población de parásitos, sin embargo no se descarta la posibilidad de un mecanismo de infección por transmisión extracelular del virus.

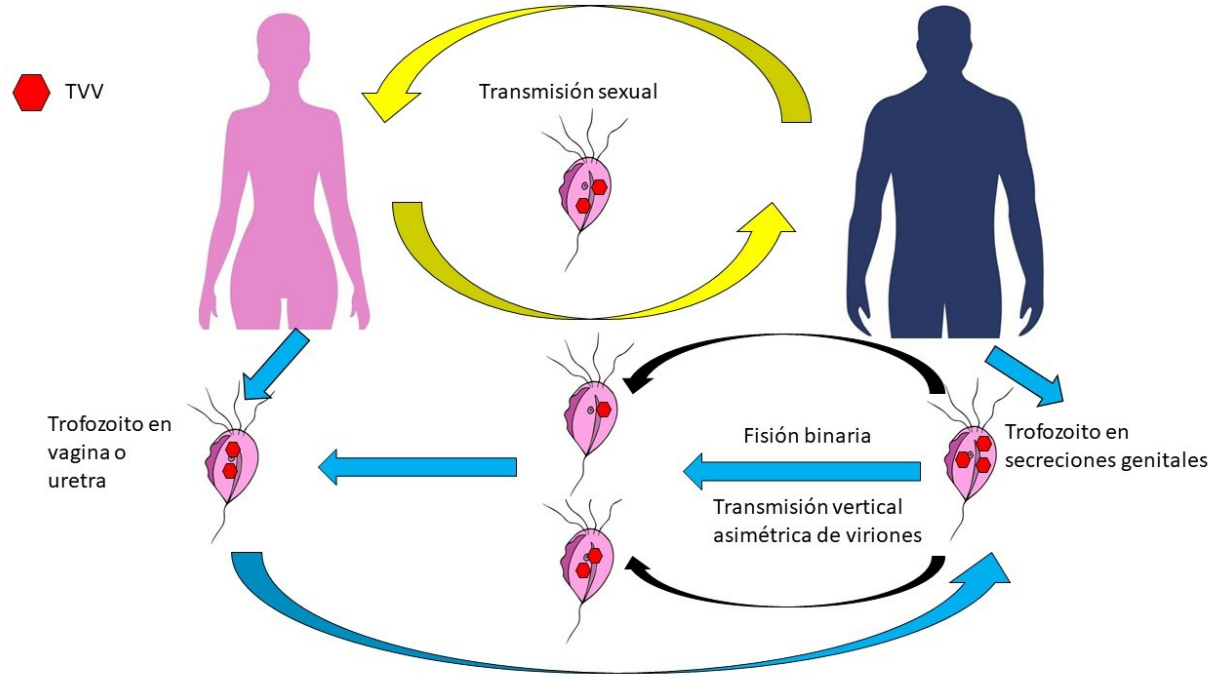


Figura 7. Ciclo de vida de *Trichomonasvirus*: donde se incluye en qué momento ocurre el ciclo viral.

Dentro de los análisis filogenéticos de la familia Totiviridae, la especie más cercana de los TVV es GLV, pero se reconocen varias diferencias moleculares como su similitud en secuencia de CP/RdRp con un rango entre 10,2 a 17,3% (Tabla 1), fisiológicas como la transmisión que en TVV se desconoce una estrategia de infección extracelular, aunque se conocen procesos de endocitosis en *Trichomonas vaginalis.* (Costamagna y Figueroa 2001). Esta diferencia de transmisión entre GLV y las especies de TVV se puede dar porque los dominios de la cápside son diferentes y además podría relacionarse con que la proteína CP de GLV tiene una mayor extensión del extremo N-terminal. Por otra parte se reconoce que las cápsides de GLV resisten mayores temperaturas (70 a 75ºC) que TVV (60 a 65ºC), y el pH óptimo de replicación de GLV es de 8,0 que corresponde al pH de varias secciones intestinales (Janssen et al 2015, Vázquez et al 2012), mientras que el de TVV es de 6,5. Las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de trofozoitos de *T. vaginalis* ocurre en un pH > 6,5, sin embargo *in viv*o los trofozoítos se pueden reproducir en

un rango de pH correspondiente al pH variante vaginal, que normalmente es de 3,8 a 4,2; además el pH del citoplasma de una especie cercana a *T. vaginalis* es de 6,3, un poco más ácido comparado con el pH >7 de G*iardia lamblia* (Janssen et al 2015, Gregar et al 1996, Petrin et al 1998). Por consiguiente, el pH puede ser un factor que influya en la no transmisión extracelular de TVV, ya que el medio extracelular de *Trichomonas vaginalis* posee un pH variante que no es óptimos para la estabilidad del virión.

Tabla 1

Comparación de la similitud de aminoácidos entre las proteínas CP/RdRp de GLV y las especies de TVV.

	GLV
GLV	-
TVV1	*10,2% (16,6*)*
TVV2	*10.9% (18.9)*
TVV3	*17.6% (27.3)*
TVV4	*17.3% (28.0)*

**Los valores en paréntesis son los porcentajes de aminoácidos con función similar. Lo datos se obtuvieron con un alineamiento en EMBOSS, con la herramienta needleall para alineaciones globales pareadas usando como parámetros: matriz Blosum 62, penalidad por apertura de gap 10, penalidad por extensión de gap 0,5.*

6.5 Leishmaniavirus

Leishmaniavirus es un género que por está compuesto por dos especies: Leishmania RNA virus 1-1 (LVR1-1), que infectan a especies de *Leishmania* sp del nuevo mundo como *L. brazilensis*, y *L. guyanensis* y Leishmania RNA virus 2-1 (LVR2-1) que infecta *Leishmania major* perteneciente al viejo mundo (Nilbert et al 2013). En todas las especies el genoma está compuesto por tres ORFs, el de la proteína de la cápside CP (ORF2), de la RdRp (ORF3) y un pequeño ORF (ORF1) cercano al extremo 5'UTR, cuya existencia parece ser real pero su función no se ha demostrado (Stuart et al 1992, Tirera et al 2017) (Ver Figura 8). Las especies LVR1-1 y LVR2-1 tiene un porcentaje de similitud en aminoácidos de la CP/ RdRp de un 43% y presentan una similitud en aminoácidos en el ORF1 de 52% (Nilbert et al 2013). La especie LVR2 -1 es la única en la familia Totiviridae, que no solapa la CP con la RdRp (Sheffter et al 1995).

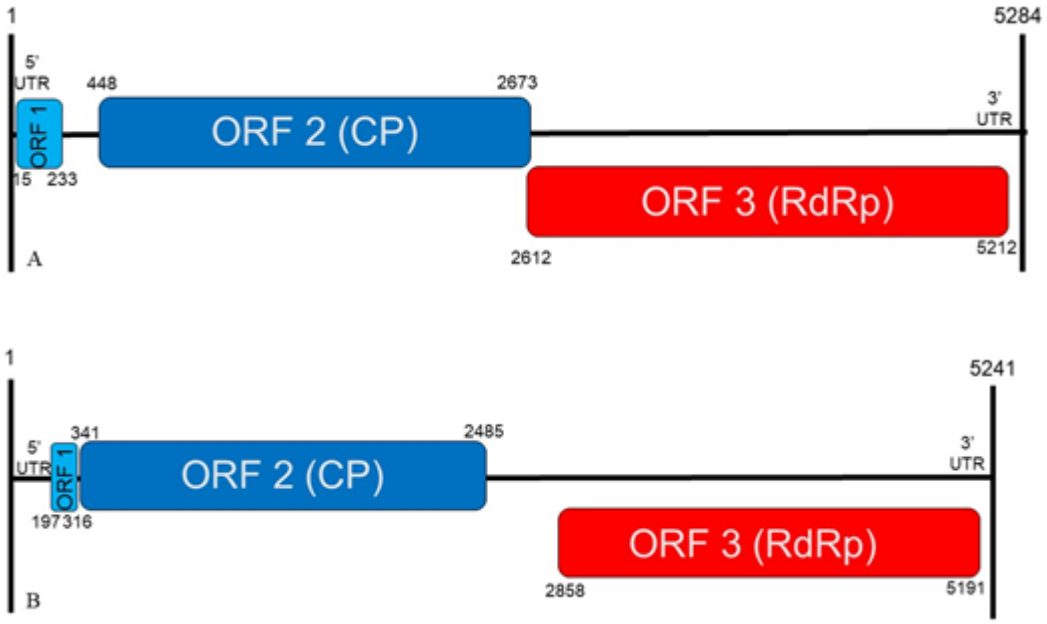


Figura 8. Organización genómica de las especies de Leishmaniavirus Organización genómica de las especies de Leishmaniavirus. A) LVR 1-1 compuesto por 5284 ribonucleótidos, basado en la secuencia del NCBI M92355.1.

B) LVR 2-1, basado en la secuencia del NCBI NC_002064.1.CP = proteína de la cápside, RdRp = polimerasa dependiente de RNA, UTR = sitios no traducidos.

El ciclo vital de las especies de *Leishmania* sp se divide en dos etapas, la etapa que está en el insecto vector que genera un estadio promastigote, y la etapa que ocurre en el hospedero mamífero que genera estadios infecciosos en el macrófago llamados amastigotes (Figura 9). Los promastigotes tienen un cuerpo delgado alargado y flagelos en la parte anterior, son móviles, y están presentes en el intestino y glándulas salivales de la mosca de la arena (flebótomo, subfamilia Phlebotominae), que actúa como vector inoculando al parásito al picar a un mamífero (Kaye y Scott 2011). Los amastigotes se multiplican asexualmente por fisión binaria dentro de los macrófagos del mamífero, poseen una morfología redondeada u ovalada, sin flagelo, se liberan por lisis del macrófago e infectan nuevos macrófagos. El ciclo continúa cuando de nuevo el flebotomo pica al mamífero infectado, y en el tubo digestivo del insecto el parásito se transforma en promastigote, se multiplica activamente y tras un periodo de 6 a 8 días, migra hacia la faringe (Gurung y Kanneganti, 2015, Pearson y Sousa 1996). Como se evidencia en la figura 9, el virión está presente en todos los estadios del ciclo de vida del protozoo, debido a que los viriones se transmiten únicamente de manera vertical, es decir por medio de la replicación del parásito, la cual ocurre de manera constante en tanto el insecto vector, como en el mamífero.

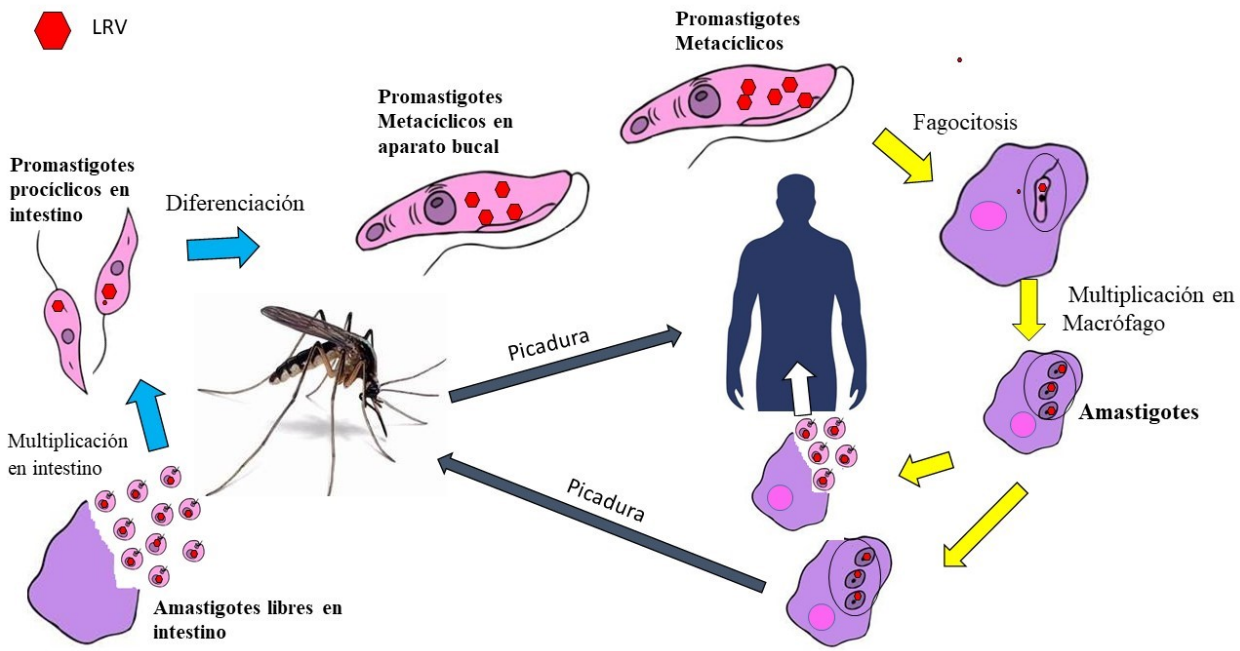


Figura 9. Ciclo de vida de Leishmania sp, teniendo en cuenta la presencia de viriones de LVR

La leishmaniasis se manifiesta principalmente en seis síntomas clínicos: infección cutánea, mucosa, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis cutánea (LC) produce úlceras o nódulos en la piel), es causadas por varias especies como *L. major, L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Kaye y Scott 2011, Chappuis et al 2007),que son infectados por LVR1-1. La leishmaniasis mucosa (LM) que genera úlceras en el tejidos nasal, tracto respiratorio y cavidad bucal (Machado et al 2015), y la leishmaniosis mucocutánea (LMC) que es la combinación de los anteriores síntomas son causadas casi siempre por *L. braziliensis*. La leishmaniasis visceral (LV) se presenta por la invasión en la sangre y el sistema retículo endotelial, con síntomas que incluyen fiebre, pérdida de peso, fatiga y agrandamiento del hígado y el bazo, es causadas por *L. infantium, L. donovani* y *L. braziliensis* (Chappuis et al 2007). La leishmaniasis diseminada (LD), un síntoma poco común que presenta una dermatosis diseminada caracterizada por pequeños y múltiples nódulos (3 - 15 mm) con los bordes enrollados en una área específica del cuerpo (Mancheno et al 2017). y leishmaniasis

cutánea difusa que presenta úlceras diseminadas en dos áreas o más del cuerpo y una gran persistencia del parásito (Zerpa y Convit 2009).

En el estudio de la relación entre la presencia LVR y los síntomas causados por *L. braziliensis* en Bolivia y Perú, 67 casos clínicos presentaban LC, y de ellos el 42% tuvieron LVR1-1, además en 17 casos de LM el 41% fueron positivos para LVR1-1, mientras en los casos de LMC solo el 7% tenía LVR1-1 (Adaui et al 2016). Estos datos se asemejan a los de la tabla 3, que corresponden a un estudio realizado en Brasil, que incluye 156 casos de leishmaniasis ocasionados por varias especies del parásito, de los cuales el 35% de los casos de LC, 71% de los casos de LM y 40% de los casos de LMC presentaron LVR1-1, además en síntomas menos comunes como LD y LCD el 75% de los casos presentó LVR1-1 (Cantanhêde et al 2015). Es importante anotar que hay una mayor frecuencia de la especie *L. braziliensis* en el estudio de Cantanhêde et al (2015), ya que 121 de 156 casos de leishmaniasis fueron causados por *L. braziliensis,* y es este caso el 38% de los pacientes con LC, 75% de los pacientes con LM y 40% de los pacientes con LMC tuvieron LVR1-1 y además un caso de LD fue positivo para LVR1-1. Por otra parte, en los 35 casos de leishmaniasis causados por otras especies de Leishmania el 43% de los que tienen síntomas de LC presentan LVR1-1, al igual que el 60% de los que tienen síntomas de LM, y en los síntomas de LD y LDC se encontraron tan solo dos casos con LVR1-1. Se ha reportado la presencia de LVR en aislados clínicos de L. braziliensis en el amazonas colombiano (Salinas 2006), pero en Colombia aún no se han hecho estudios sistemáticos que asocien la leishmaniasis con la presencia de LVR, a pesar de que éste es el tercer país con más número de especies de *Leishmania* (OMS 2012).

Con respecto a especies de Leishmania del viejo del mundo, en cuatro de ocho aislados de L. *aethiopica* procedentes de pacientes *de Etiopía* con síntomas de LC y LCD se encontró LVR2-1, con la particularidad de que todos los casos con el virus tenían la forma cutánea de la enfermedad (Zangger et al 2014). En leishmaniasis en otros vertebrados se ha reportado LVR2-1 en aislados de *L. infantum* en perros de Irán y Portugal y en *L. major* infectando gerbos (Hajjaran et al 2016, Garzis et al 2016), pero aún no se han hecho estudios que asocian el virus con las manifestaciones clínicas de la enfermedad en hospederos que no son seres humanos.

Tabla 2

Relación de los tipos de síntomas de leishmaniasis y la presencia de LVR-1 con las especies de Leishmania encontradas en casos clínicos de Rondonia, Brasil.

	LC		LM		LMC		LD		LCD	
	LV R1^{+}	LV R1^{-}	LV R1^{+}	LV R1^{-}	LV R1^{+}	LV R1^{-}	LV R1^{+}	LV R1^{-}	LV R1^{+}	LV R1^{-}
L. braziliensis	33	53	21	7	2	3	1	1	-	-
L. guayanensis	2	10	3	3	-	-	-	-	-	-
L. lainsoni	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
L. amazonensis	-	-	-	-	-	-	1	0	1	0
L. shawi	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-

Leishmania spp[a]	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-

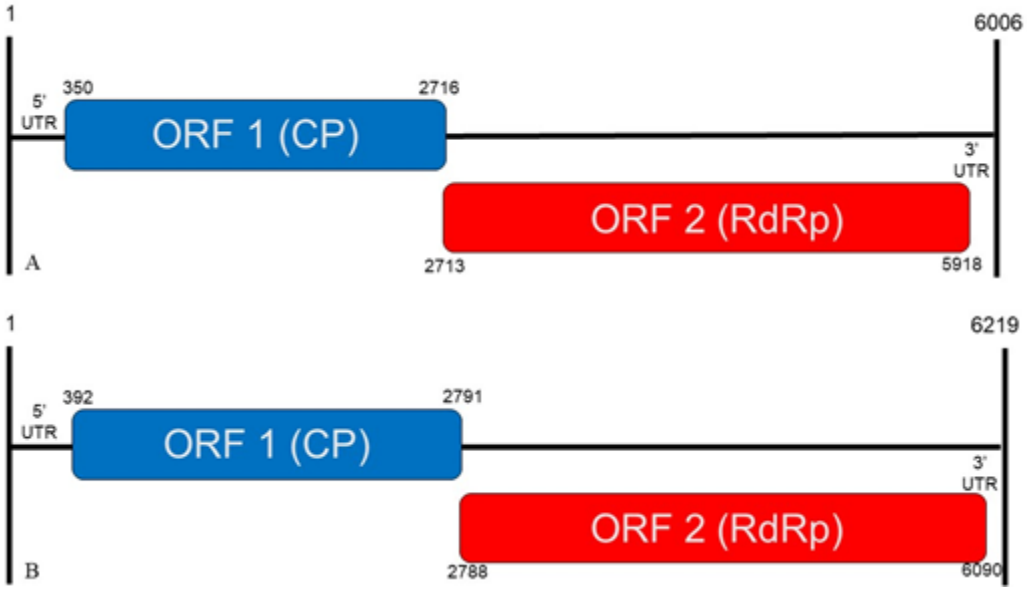
Esta tabla fue realizada con los datos del estudio de Cantanhêde et al (2015). LC = Leishmaniasis cutánea, LM = Leishmaniasis mucosa, LMC = Leishmaniasis mucocutánea, LD = Leishmaniasis diseminada, LCD = Leishmaniasis cutánea difusa, LVR1^{+} = presencia de Leishmania RNA virus 1 y LVR1^{-} = ausencia de Leishmania RNA virus 1
[a] *Casos de Leishmania que no se pudieron determinar hasta el nivel de especie*

Los datos descritos previamente sugieren que no hay una relación directa del tipo de leishmaniasis respecto a la presencia de LVR1-1, por lo menos no en los datos que se han recolectado en *L. braziliensis*. La presencia de LVR1-1 es más notable en *L. braziliensis* y está presente en todos los síntomas clínicos que causa el parásito, lo cual se explica por las características epidemiológicas propias de *L. braziliensis* como su distribución geográfica en América con una mayor prevalencia en Suramérica, causando principalmente LC y LM; sin embargo, LVR1-1 parece estar presente en todas las especies de *Leishmania* que están Sudamérica y en todos los síntomas clínicos que estas causan. Es importante aclarar que los tipos de leishmaniasis, son diferentes a la gravedad que puedan tener cada tipo de enfermedad, y que el rol del LVR1-1 está ligado a la gravedad de la enfermedad, lo cual será abordado detalladamente en el siguiente capítulo. Así mismo, faltan estudios en otras especies de *Leishmania* para confirmar los efectos de LVR1-1 en los síntomas de leishmaniasis, y se requieren estudios de la relación de LVR2-1 con leishmaniasis causadas en el viejo mundo, que ayudarían a entender la relación entre totivirus y especies de Leishmania en general.

6.6 Generalidades de totivirus en protozoos de interés veterinario.

Con respecto a virus de la familia Totiviridae en los protozoos de interés veterinario se han reportado totivirus en especies pertenecientes al supergrupo taxonómico Alveolata,

particularmente en especies del género Eimeria, parásitos intestinales intracelulares de invertebrados y vertebrados que causan coccidiosis por ejemplo en aves de corral (Del Cacho 2013, Hnida y Duszynski 1999). Específicamente en las especies *E. tenella*, *E. brunetti* y *E. stiedai* se han descrito virus nombrados *Eimeria brunetti RNA virus 1* (EbRV1), y *Eimeria tenella RNA virus 1* (EtRV1) y *Eimeria stiedai virus 1* (EsRV1) (Wu et al 2016, Xin et al 2016),con un genoma de 5358, 6006 y 6219 ribonucleótidos respectivamente (figura 10), siendo E. stiedai un parásito de conejos. En la especies E. maxima y E. necatrix se han informado actividad síntesis de RNA en extractos de esporozoitos que contenían una proteínas de tipo RdRp asociadas a dsRNA viral (Lee y Fernando 1999).



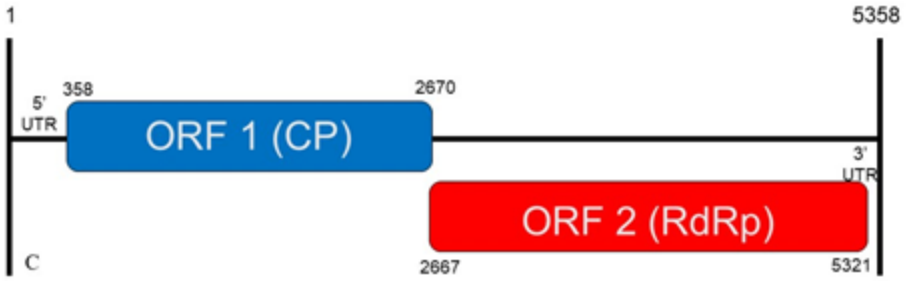


Figura 10. Organización genómica de Eimeriaviruses A) EtVR1, basado en la secuencia del NCBI KJ363185.1 B) EsVR1, basado en la secuencia del NCBI KU597305.1. C) EbVR1, basado en la secuencia del NCBI AF356189.1. CP = proteína de la cápside, RdRp = polimerasa dependiente de RNA, UTR = sitios no traducidos.

Las especies de *Eimeria* se transmiten a partir de la ingesta de agua y alimentos contaminados con ooquistes esporulados que entran a un ciclo de vida complejo con varios estadios de desarrollo (esporozoítos, trofozoítos, esquizontes, merozoitos, gametos, ooquiste no esporulados que se liberan en las heces y ooquistes esporulados que maduran en el ambiente externo). Aunque no se ha descrito la estrategia de transmisión de los Eimeriavirus, se han encontrado viriones de EtVR1 y EsVR1 en ooquistes esporulados (Wu et al 2016, Xin et al 2016), y evidencia de actividad de RdRp en esporozoitos (Lee y Fernando 1999). Esto significa que los viriones se han encontrado asociados a la fase celular y de enquistamiento y es posible que estén presentes en todo el ciclo de vida de Eimeria, y que puedan tener una estrategia de transmisión intracelular como ocurre en TVV y LVR, sin embargo se necesitan estudios donde evalúen la transmisión extracelular infectado cepas de Eimeria libres de virus con viriones purificados.

7. CAPÍTULO 2: RELACIÓN ENTRE PATOGENICIDAD DEL PARÁSITO Y LA PRESENCIA DE TOTIVIRUS

7.1. Distribución de totivirus en Excavata y Alveolata patógenos y no patógenos

El supergrupo taxonómico Excavata incluye protistas caracterizados por poseer un orgánulo locomotor flagelado, y tener un surco de alimentación en suspensión sin embargo se discute actualmente si el grupo es monofilético debido a sus diversos ciclos de vida y morfología celular que presentan (Adl et al 2012, Hampl et al 2009, Dawson y Paredes 2013). Los excavados presentan una variedad de estrategias metabólicas y estilos de vida que incluyen desde organismos fotosintéticos hasta parásitos (Tabla 3)

Los grupos de excavados donde no se han reportado virus de la familia Totiviridae son:

- Heterolobosea: generalmente ameboides con pseudópodos eruptivos, pero aunque con morfología similar grupo Amebozoa no son tan cercanos debido a que su alimentación es por medio de un citostoma similar a un surco y la mayoría de las especies son de vida libre, alimentándose de bacterias y otros protozoos (Adl et al 2012), excepto la especie *Naegleria fowleri* que puede ser un parásito facultativo causando la meningoencefalitis en humanos (Oddó 2006, Petit et al 2006).

- Jakobida: protozoos que presentan dos flagelos en la parte anterior en el surco de alimentación, principalmente de vida libre, conquistando ambientes aeróbicos y anaeróbicos, además se alimenta generalmente de bacterias (Adl et al 2012).
- Preaxostyla: células sin mitocondria clásica, que pueden ser endosimbiontes que se adhieren al intestino de las termitas (Radek 1994) o de vida libre (Adl et al 2012).

Tabla 3

Relación entre forma de vida y presencia de totivirus

Especies	**Familia**	**Presencia de Totivirus**	**Estrategia metabólica**	**Estilo de vida**	**Tipo de parasitismo**	**Transmisión por vector**
Malawimonas sp	Heterolobosea	No	Heterótrofa y fotótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Sawyeria sp	Heterolobosea	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Naegleria sp	Heterolobosea	No	Heterótrofo	Parásito	Facultativo	No presenta
Andalucia sp	Jakobida	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Histiona sp	Jakobida	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Reclinomonas sp	Jakobida	No	Heterotrófico	Vida libre	No presenta	No presenta
Jakoba sp	Jakobida	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta

Especies	Familia	Presencia de Totivirus	Estrategia metabólica	Estilo de vida	Tipo de parasitismo	Transmisión por vector
Trimastix sp	Preaxostyla	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Monocercomonoides sp	Oxymonadid	No	Heterótrofo	Vida libre	No presenta	No presenta
Euglena sp	Euglenozoa	No	Autótrofa	Vida libre	No presenta	No presenta
Angomas sp	Euglenozoa	PB	Heterótrofo	Endosimbiontes con bacterias y parásito de insectos	Extracelular	No presenta
Trypanosoma sp	Euglenozoa	PB	Heterótrofo	Parásito multiórganos	Intracelular	Dípteros de la familia Triatominae

Especies	Familia	Presencia de Totivirus	Estrategia metabólica	Estilo de vida	Tipo de parasitismo	Transmisión por vector
Leishmania sp	Euglenozoa	Si	Heterótrofo	Parásito multiórganos	Intracelular	Dípteros de la subfamilia Phlebotominae
Phytomonas sp	Euglenozoa	PB	Heterótrofo	Parásito de plantas	Intracelular	Por una amplia gama de insectos
Giardia sp	Fornicata	Si	Heterótrofo	Parásito Intestinal	Extracelular	No presenta
Trichomonas sp	Parabasalia	Si	Heterótrofo	Parásito Genital	Extracelular	No presenta

Especies	Familia	Presencia de Totivirus	Estrategia metabólica	Estilo de vida	Tipo de parasitismo	Transmisión por vector
Plasmodium sp	Apicomplexa	No	Heterótrofo	Parásito	Intracelular	Dipteros del género Anopheles
Dinophysis sp	Dinoflagellata	No	Autótrofo	Vida libre		
Eimeria sp	Apicomplexa	Si	Heterótrofo	Parásito	Intracelular	
Cryptosporidium sp	Apicomplexa	No	Heterótrofo	Parásito	Intracelular	

Nota, las especies fueron tomados de la filogenia del supergrupo Excavata, propuesta por Hamp et al 2009

[a] *PB= probablemente,*

Los euglenozoa son un grupo de individuos generalmente con dos flagelos, presentan crestas discoidales mitocondriales, con formas de vida que van desde fotoautótrofas como las especies que habitan en medios acuáticos y marinos (Asl et al 2012), hasta parásitos de animales y plantas pertenecientes al grupo Trypanosomatida que son transmitidos por medio de un vector (tabla 3), por ejemplo las especies de *Leishmania* o *Trypanosoma*. Hasta el momento sólo se ha reportado una mayor prevalencia de LVR1-1 en las especies de Leishmania del nuevo mundo (Adaui et al 2017), sin embargo parece ser que LVR2-1 también mantiene una presencia continua en las especies de Leishmania del viejo mundo. Adicionalmente, por medio de micrografías electrónicas se han detectado partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) con características físicas similares a viriones de la familia Totiviridae (forma de icosaedro y un tamaño entre 20 a 40 nm) cerca del aparato de Golgi en epimastigotes de Trypanosoma cruzi (Fernández et al 2017) y en tripanosomátidos del género Phytomonas sp. que infectan palmeras sudamericanas (familia Arecaceae), causandoles la enfermedad de marchitez sorpresiva (Marche et al 1993).

Además se han realizado reportes de viriones de la familia Totiviridae en el grupo metamonada, conformado por protozoos anaerobios, con mitocondrias que carecen de genoma propio y que no hacen respiración celular (Adl et al 2012), algunos de los cuales son organismos de vida libre como Carpediemonas membranifera, que es un protozoo marino (Simpson y Patterson 1999), otros endosimbiontes y varios parásitos. Los reportes virales se han hecho únicamente en los parásitos Giardia lamblia y Trichomonas vaginalis, sin embargo sería pertinente hacer búsqueda de VLPs con características de la familia Totiviridae en especies no parásitas y de esta manera establecer las generalidades de la relación de estos virus con este linaje de excavados.

Además de las tres especies de Eimeriavirus descritas, en *E. nieschulzi* parásito del ratón marrón, se encontraron viriones por microscopia electrónica que miden 39 nm y tienen forma de poliédrico (Roditi et al 1994). En el trabajo de Roditi et al (1994) se reportó la secuencia parcial de RdRp (123 aminoácidos) lo cual no fue suficiente para encontrar una similitud significativa con las especies virales ya descritas. A partir de análisis filogenéticos la especies EsRV1, EbRV1 y EtRV1 se agruparon cerca del género *Victovirus*, que infectan a hongos, y por eso Xin et al (2016) propone la creación del género Eimeriavirus, debido a su agrupación como un grupo hermano de las especies de *Victovirus.*

La infección de totivirus con protozoarios es demasiado amplia, ya que se han encontrado viriones en dos super grupos taxonómicos Excavata y Alveolata e igualmente estos dos grupos son demasiados diversos. Las especies del género Eimeria perteneciente a los alveolados, son especies que infectan a animales domésticos y que están emparentadas evolutivamente con especies que causan la coccidiosis humana (*Isospora belli* y *Cryptosporidium parvum*) (Arcay 2002), de tal manera que es posible encontrar virus de la familia Totiviridae en estos protozoos de interés médico.

7.2. Interacciones virus-protozoo que modifican la patogenicidad de euglenozoos

La leishmaniasis se da por medio de la picadura de un flebotomo infectado con Leishmania, una vez entran los promastigotes, el hospedero genera una respuesta inmune diversa que depende de la especie, de tal manera que el tipo de leishmaniasis depende de la respuesta inmune que se desarrolla en el hospedero, y esta respuesta inmune depende de factores como el estado nutricional, los medicamentos tomados y expresiones genética propias del paciente, además de infecciones por parte de helmintos y condiciones de inmunosupresión como la que genera el virus

del VIH. Todas estas condiciones favorecen una respuesta Th2, que consiste en producción de citoquinas que favorecen la inflamación. (Agudelo y Robledo 2000)

En el tejido epitelial normalmente habitan macrófagos los cuales fagocitan a los promastigotes. Una vez fagocitado el parásito empieza el proceso de diferenciación de promastigote a amastigote mientras el macrófago infectado desencadena una actividad inflamatoria que incluye la migración y retención de más fagocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos hacia el sitio infectado (Agudelo y Robledo 2000, Vera et al 2006), seguido de una secreción de las citoquinas IFN-γ, IL-1 y TNF-α, y las quimiocinas CXCL10 y CCL5 que ayudan a generar una resistencia al parásito, iniciando una curación de las lesiones. Por otra parte también puede darse una respuesta inmune donde se secretan las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-6 que favorecen la persistencia del parásito (Kariyawasam et al 2017); la acumulacion de células del sistema inmune y estas citoquinas dañan al tejido epitelial causando unos granulomas que con el tiempo se manifiestan como úlceras en la piel o en la zona infectada (Agudelo y Robledo 2000).

La presencia de LVR ayuda a desviar la respuesta inmune del hospedero del parásito, ya que activa un receptor intracelular en el macrófago llamado receptor de tipo Toll-3 (TLR-3 por sus siglas en inglés) que reconoce RNA viral liberado por el parásito, generando una secreción de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que causa síntomas hiper inflamatorios aumentando la gravedad de la enfermedad (Hartley et al 2012). La secreción de estas citocinas se ha confirmado en líneas celulares de macrófagos infectadas con *L. braziliensis* positivas para LVR1-1 (Kariyawasam et al 2017). En un estudio de respuesta al Glucantime® se siguieron 54 pacientes de Perú y Bolivia infectados con *L. braziliensis y* con síntomas de LC, LM y LMC, 17 de éstos portaban LVR1-1 y

de estos el 53% (9) fallaron en el tratamiento, mientras que en los que no presentaron LVR1-1 sólo el 24/% no respondieron al tratamiento, lo cual sugiere que la presencia de LVR1-1 puede tener una relación con el fracaso del tratamiento (Adui et al 2016). El glucantime es un antimonial pentavalente que interviene en la ruta metabólica para la obtención de energía de Leishmania (Moreira et al 2017) y algunos investigadores piensan que activa genes involucrados en la activación de respuesta inmune anti-inflamatoria, como se ha descrito para la miltefosina, otro compuesto para el tratamiento de esta parasitosis (Dorlo et al 2012).

Además en estudios donde se realizó un seguimiento de tres a seis meses a 74 pacientes tratados con isetionato de pentamidina de los cuales 44 presentaban LVR1-1, 13 pacientes (17,3%) presentaron una recaída. En este caso el tratamiento sólo disminuyó la proporción del parásito pero no lo exterminó. Todos los 13 pacientes portaban LVR1-1, por lo tanto se puede afirmar que el cambio que produce LVR1-1 en la respuesta inmune del hospedero de Leishmania facilita la persistencia del parásito, incluso cuando se da un tratamiento antileishmanial (Bourreau et al 2016).

Respecto a la relación con LVR2-1 con la patogenicidad de leishmaniasis causada en el viejo mundo, en *L. aethiopica* se ha descrito una respuesta inmune similar a lo que ocurre en leishmaniasis en el nuevo mundo, lo cual incluye una respuesta mediada por el receptor TLR-3, generando la secreción de citocinas IL-6 y TNF-α que ayudan a una manifestación de LC hiperinflamatoria, pero la secreción de esta quimiocinas es menor que en especies del nuevo mundo, gracias a que los promastigotes de *L. aethiopica* liberan menos RNA (Zangger et al 2014).

Es interesante anotar que en casos de coinfección con virus de humanos que también se transmiten por medio de un vector flebótomo (flebovirus), como es el virus de las toscana TOSV y el virus de la coriomeningitis (LCMV), también se observa una mayor prevalencia de L. guyanensis y aumentó su patogenicidad gracias a que se genera una respuesta inmune antiviral similar a la de LVR (Rossi et al 2017). Por lo tanto, la respuesta inmune que generan los virus de RNA ya sean transmitidos directamente, o que estén dentro de un parásito favorecen la reproducción de parásitos intracelulares como *Leishmania*.

7.3. Efecto de los totivirus sobre los mecanismos de patogenicidad de metamónados

7.3.1. Patogenicidad de *T. vaginalis*

La infección de *T. vaginalis* se da por medio del contacto sexual y se establece en condiciones de pH alcalino. Una vez el parásito entra se adhiere a las células epiteliales de los órganos reproductores pero para que se establezca una infección exitosa con síntomas se deben cumplir ciertas condiciones como la citoadherencia fuerte de los trofozoítos a estas células epiteliales, citotoxicidad, disrupción del citoesqueleto de los glóbulos rojos y hemólisis a través de actividad de cisteína proteasas, y evasión de la respuesta inmune del huésped (Mielczarek y Blaszkowska, 2016, Hernández, Marcet, y Sarracent 2014).

Una vez el trofozoito se adhiere a la células cervicales ó prostáticas del hospedero adquiere una forma ameboide gracias a una reorganización de las proteínas del citoesqueleto; esta forma ameboide secreta muchas proteasas que le ayudan a tener una movilidad en el tejido epitelial que conlleva a la lisis celular del epitelio y causa debilitamiento de las uniones intercelulares de la monocapa epitelial y de la membrana basal. Otras proteasas causan poros en los glóbulos rojos

originando una hemólisis que genera un ambiente rico en hierro, favorable para la multiplicación del parásito. Además, la forma ameboide de *T. vaginalis* fagocita células epiteliales y del sistema inmune y microorganismos comensales como parte de su proceso de nutrición (Mielczarek y Blaszkowska, 2016, Edwards et al 2014).

La respuesta inmune que desencadena *T. vaginalis* en el momento de la adhesión incluye aumento del número de leucocitos y linfocitos de tipo T y B en el lugar de la infección, seguido de una secreción de citocinas IL-8 e inmunoglobulinas A y G, todo lo cual puede generar una respuesta proinflamatoria que se asocia con los síntomas de la tricomoniasis (Mielczarek y Blaszkowska 2015). Sin embargo, *T. vaginalis* posee varias formas de evadir el sistema inmunitario entre ellas la secreción de peptidasas de cisteína que degradan la inmunoglobulina (Provenzano y Alderete 1995), el mimetismo molecular a partir de la adquisición de proteínas del huésped como la CD59 que le permite evitar el sistema de complemento lítico (Ibáñez-Escribano et al. 2015), y la capacidad de cubrirse con proteínas plasmáticas del huésped (Mielczarek y Blaszkowska 2015).

El proceso de adhesión del parásito a células cervicales y prostáticas está mediado por una serie de proteínas, lipofosfoglcanos y adhesinas que se encuentran en la superficie del trofozoito (Mielczarek y Blaszkowska 2015). En particular es aquí donde TVV interviene aumentando la transcripción de las proteínas AP55 y AP33 que están involucradas con el proceso de adhesión (He et al 2017). Igualmente, la presencia de TVV genera un aumento en la transcripción de la proteína inmunogénica P270 (Khosnan y Aldarete 1994) y se asocia con un aumento de la expresión de cisteína proteasas que aún no se han reconocido (Hernández, Marcet, y Sarracent

2014) En consecuencia, la presencia de TVV genera cambios que aumentan la citoadherencia y la degradación de la inmunoglobulina presente en la mucosa; esto genera una mayor probabilidad de infección exitosa, cuyo curso dependerá de que el reconocimiento del parásito por el sistema inmune resulte favoreciendo al parásito.

Hay razones para pensar que la presencia de TVV genera un efecto similar al de LVR sobre la virulencia de Leishmania. La tricomoniasis en la mayoría de los casos es asintomática y cuando se presentan síntomas es porque ha habido respuesta pro-inflamatoria. Esta respuesta parece ser modulable por la presencia de TVV ya que se ha visto que el RNA de TTV liberado por *T. vaginalis* a través de exosomas, probablemente durante el cambio a la forma ameboide, es reconocido por un receptor TLR3 que está presente en la superficie de las células ectocervicales de la vagina (Leitsch 2016, Fichorova et al 2012). Esta detección de RNA viral podría provocar una respuesta proinflamatoria sintomática en la mujeres, pero hacen falta estudios que muestren si también hay receptores TLR3 en los tejidos colonizados en los hombres, y que establezcan cuál es la relación de TVV con la sintomatología y por ende con la respuesta inmune que genera TVV.

La infección con *T. vaginalis* en los hombres generalmente es asintomática, pero cuando es sintomática hay una inflamación de la uretra, o ocasionalmente en el epidídimo, la glándula prostática y en el testículo (Mielczarek y Blaszkowska 2015). Los casos de tricomoniasis que generan inflamación en la próstata se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de próstata, lo cual puede deberse a que el proceso de inflamación causado por la secreción de citocinas proinflamatorias activadas por el TLR3 causan una ruta que propicia el origen del cáncer de próstata (Sutcliffe et al 2012, Stark et al 2009). Por consiguiente, es necesario estudiar la

relación de TVV con la respuesta inmune y posteriormente con el proceso desencadenado al origen de cáncer de próstata.

6.3.2. Patogenia de *Giardia duodenalis*

La infección por *Giardia duodenalis* empieza con el consumo de agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, una vez ingeridos estos viajan por el sistema digestivo y en el medio ácido del estómago se da el desenquistamiento que conlleva al estadio de trofozoito. Esta forma se adhiere a las células epiteliales del intestino mediante un disco adhesivo formado por proteínas llamadas giardinas (Tejeda et al 2010, Buret et al 2015). La adhesión de Giardia ocurre sobre las microvellosidades que tienen las células epiteliales de cara a la mucosa gástrica y que están formadas por múltiples proteínas. Las vellosidades aumentan la superficie de captación de moléculas y por tanto intervienen en los balances osmóticos que permiten la absorción de glucosa, agua y sodio; la adhesión del parásito atrofia esta función del tejido epitelial causando diarrea como primer síntoma.

También se liberan enzimas involucradas en la degradación de arginina (arginina arginina dehidrolasa, arginina deaminasa y ornitina carbamoil transferasa), que es el mecanismo de obtención de energía de Giardia; como consecuencia de esto el epitelio intestinal disminuye la producción de óxido nítrico, debido a que es formado a partir de la arginina. Como se describe más adelante, la disminución del óxido nítrico ejerce una función inmunosupresora (Bazan et al 2010), pero adicionalmente la disminución del óxido nítrico afecta la motilidad intestinal debido a que es un neurotransmisor involucrado en los movimiento gastrointestinales generados por el sistema nervioso entérico (Romero et al 2012). En estados posteriores las células intestinales pueden entrar en apoptosis debido a la mala absorción de moléculas esenciales para su

metabolismo, generando un deterioro del tejido e intensificado la diarrea y náuseas, lo que resulta en la giardiasis aguda (Bazán et al 2010; Buret et al 2015).

La respuesta inmune que se genera en el intestino en presencia de Giardia es la secreción de inmunoglobulina tipo A, citocinas (IL-5) y quimiocinas (CXCL1-3, CCL2 y CCL20), por parte de las células del sistema inmune como los linfocitos tipo T, neutrófilos y mastocitos que están en la mucosa intestinal (Fink y Singer 2017). Se ha detectado que la baja producción de óxido nítrico de las células epiteliales conlleva a disminución de la secreción de inmunoglobulina tipo A (Bazán et al 2010) y se han identificado proteínas secretadas por *Giardia* como las cisteína proteasas de catepsina que son capaces de degradar la quimiocina CXCL8, encargada de atraer a lo neutrófilos e inducir una respuesta proinflamatoria. Esto implica que Giardia posee la facultad de evitar una respuesta inmune inflamatoria, pero como tal no se conoce de forma clara el mecanismo por el que esto ocurre (Cotton et al 2015).

Hasta el momento no hay evidencia sugerente de que la presencia de GLV tenga relación con la patogenicidad de *Giardia* (Miska et al 2009). Considerando que en leishmaniosis y en tricomoniasis el aumento de la virulencia del protozoo por presencia del totivirus parece estar mediado por moléculas TLR, posiblemente en las infecciones de Giardia con GLV la señalización que surge de estos TLRs no ocurre. En distintos modelos se ha visto que las células epiteliales intestinales expresan moléculas TLR3 de superficie que desencadenan respuesta inmune contra virus con material genético de dsRNA; en el caso del rotavirus humano el TLR3 de las células epiteliales intestinales reconoce el RNA del virus y genera una reacción protectora, mientras que por el contrario en modelo murino el reconocimiento de RNA del virus de la influenza A resulta

en una respuesta proinflamatoria (Pott et al. 2012). La transmisión extracelular de GLV genera viriones que entran en contacto directo con la mucosa intestinal, pero debido a que su cápside es más resistente que la de TVV y LVR (Janseen et al 2015) esta vía genera poco RNA detectable por el TLR3 de superficie. Adicionalmente, tanto en leishmaniosis como en trichomoniasis la interacción del RNA viral con los TLR está asociada a la formación de exosomas, pero en *G. duodenalis* se ha descrito que la vía de transporte mediado por vesículas lipídicas no es completamente funcional (Franzén et al. 2013) y podría no ser eficiente en la movilización de RNA viral hasta el exterior del parásito.

8 CONCLUSIONES

La relación evolutiva entre los virus de la familia Totiviridae respecto a sus hospederos protozoos se evidencia en la concordancia de sus filogenias, lo cual es característico de las relaciones co-evolutivas. Además las características de la relación virus-hospedero en la familia Totiviridae son diversas, por ejemplo los géneros *Totivirus* y *Victorivirus* que infectan a hongos que son patógenos de plantas disminuyen la virulencia del hongo, mientras virus de los géneros LVR y TVV aumentan la persistencia de manifestaciones clínicas; en los virus con transmisión extracelular como GLV aumenta el proceso de enquistamiento de *Giardia lamblia*, y los virus de animales generan efecto citopático. Es decir, la relación evolutiva está por tanto ligada a la estrategia de transmisión debido a que el virus altera la maquinaria molecular del protozoo hospedador para asegurar su transmisión.

Desde el punto de vista epidemiológico los totivirus aumentan la prevalencia de leishmaniasis cutánea y tricomoniasis con manifestaciones severas y algunos estudios indican que se afecta la efectividad en los tratamientos con fármacos convencionales y se propician las recaídas, por lo cual las prioridades de investigaciones futuras se centran en cómo tener en cuenta la presencia del virus para diagnosticar la patología y posteriormente definir el esquema de tratamiento.

La interacción molecular entre totivirus y los protozoos parásitos parece estar ligada a la estrategia de transmisión del virus y al tráfico de su RNA, debido a que en los virus que poseen transmisión vertical, y el protozoo mantiene una división celular constante, se da una liberación de RNA viral en el momento de la infección del parásito, y el cual es reconocido por moléculas TLR3 del hospedero del protozoo, desencadenando una respuesta inmune inflamatoria que los beneficia en su persistencia en el hospedero.

Para comprender la relación entre estos virus y protozoos faltan estudios de identificación de virus con características de la familia Totiviridae en protozoos con otros estilos de vida, a través de rastreos de VLPs complementados con secuenciación de RNAs totales obtenidos del protozoo o de RNAs obtenidos tras purificación de las partículas virales.

9. REFERENCIAS

Adaui, V., Lye, L. F., Akopyants, N. S., Zimic, M., Llanos-Cuentas, A., Garcia, L., … Beverley, S. M. (2016). Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Peru and Bolivia. *Journal of Infectious Diseases*, *213*(1), 112–121. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv354

Adl, S. M., & Needs Authors, O. (2013). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryote Microbiology*, *59*(5), 1–45. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.The

Agudelo, S. del P. L., & Restrepo, S. M. R. (2000). Respuesta inmune en infecciones humanas por Leishmania spp. *Iatreia*, *13*(3), pág. 167-178. Retrieved from http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/3775

Banik, G., Stark, D., Rashid, H., & Ellis, J. (2015). Recent Advances in Molecular Biology of Parasitic Viruses. *Infectious Disorders - Drug Targets*, *14*(3), 155–167. https://doi.org/10.2174/1871526514666140713160905

Bazán, T. M., Argüello, G. R., Fonseca, L., Svärd§, S., & Ortega-Pierres, G. (2010). Adhesion of giardia to epithelial cells: structures, molecules and pathogenicity. *Parasitology Research Trends*, *1*(978-1-60741-436–0), 1–23.

Boland, G. J. (2004). Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of Sclerotinia species. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *26*(1), 6–18. https://doi.org/10.1080/07060660409507107

Bourreau, E., Ginouves, M., Prévot, G., Hartley, M.-A., Gangneux, J.-P., Robert-Gangneux, F., … Ronet, C. (2016). Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *Journal of Infectious Diseases*, *213*(1), 105–111. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv355

Cantanhêde, L. M., da Silva Júnior, C. F., Ito, M. M., Felipin, K. P., Nicolete, R., Salcedo, J. M. V., … Ferreira, R. de G. M. (2015). Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(9), 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004079

Cao, L., Gong, P., Li, J., Zhang, X., Zou, X., Tuo, W., … Su, L. (2009). Giardia canis: Ultrastructural analysis of G. canis trophozoites transfected with full length G. canis virus cDNA transcripts. *Experimental Parasitology*, *123*(3), 212–217. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.001

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., … Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, *5*(11), 873–882. https://doi.org/10.1038/nrmicro1748

Chen, L., Li, J., Zhang, X., Liu, Q., Yin, J., Yao, L., … Cao, L. (2007). Inhibition of krr1 gene expression in Giardia canis by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Veterinary Parasitology*, *143*(1), 14–20. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.029

Costamagna, S. R., & Prado, F. M. (2001). On the ultrastructure of Trichomonas vaginalis: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitología Al Día*, *25*(3–4), 100–108. https://doi.org/10.4067/S0716-07202001000300006

Cotton, J. A., Motta, J. P., Schenck, L. P., Hirota, S. A., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014). Giardia duodenalis infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS ONE*, *9*(10), 1–

15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109087
Cotton, J., Amat, C., & Buret, A. (2015). Disruptions of Host Immunity and Inflammation by Giardia Duodenalis: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. *Pathogens*, *4*(4), 764–792. https://doi.org/10.3390/pathogens4040764
Dawson, S. C., & Paredez, A. R. (2013). Alternative cytoskeletal landscapes: cytoskeletal novelty and evolution in basal excavate protists. *Curr Opin Cell*, *25*(1), 134–141. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.11.005.Alternative
Del Cacho, E. (2013). Coccidiosis : La enfermedad , consecuencias y tratamiento. *Congreso Cientifico de Agricultura*, 1–7.
Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(11), 2576–2597. https://doi.org/10.1093/jac/dks275
Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2016). Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(3), 406–417. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958050
Ergunay, K., Kasap, O. E., Orsten, S., Oter, K., Gunay, F., Yoldar, A. Z. A., … Ozkul, A. (2014). Phlebovirus and Leishmania detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. *Parasites and Vectors*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0575-6
Fernándezl, P. A. M., Padilla, N. L., Ingeborg, B., Robert, L., Jiménez, J. A., Solano, S., … Molinari, J. L. (2013). Enveloped and non-enveloped viral-like particles inTrypanosoma cruzi epimastigotes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, *1*(1), 36–43. https://doi.org/10.5144/0256-4947.2012.37
Fichorova, R. N., Lee, Y., Yamamoto, H. S., Takagi, Y., Hayes, G. R., Goodman, R. P., … Nibert, M. L. (2012). Endobiont Viruses Sensed by the Human Host - Beyond Conventional Antiparasitic Therapy. *PLoS ONE*, *7*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048418
Fink, M. Y., & Singer, S. M. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in Parasitology*, *33*(11), 901–913. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001
Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Ankarklev, J., Ferella, M., Andersson, B., & Svärd, S. G. (2013). Transcriptome Profiling of Giardia intestinalis Using Strand-specific RNA-Seq. *PLoS Computational Biology*, *9*(3), 11–13. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003000
Fu, C. J., Sheikh, S., Miao, W., Andersson, S. G. E., & Baldauf, S. L. (2014). Missing genes, multiple ORFs, and C-to-U type RNA editing in Acrasis kona (Heterolobosea, Excavata) mitochondrial DNA. *Genome Biology and Evolution*, *6*(9), 2240–2257. https://doi.org/10.1093/gbe/evu180
Gile, G. H., Faktorová, D., Castlejohn, C. A., Burger, G., Lang, B. F., Farmer, M. A., … Keeling, P. J. (2009). Distribution and phylogeny of EFL and EF-1α in Euglenozoa Suggest ancestral co-occurrence followed by differential loss. *PLoS ONE*, *4*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005162
Goodman, R. P., Freret, T. S., Kula, T., Geller, A. M., Talkington, M. W. T., Tang-Fernandez, V., … Nibert, M. L. (2011). Clinical Isolates of Trichomonas vaginalis Concurrently Infected by Strains of Up to Four Trichomonasvirus Species (Family Totiviridae). *Journal of Virology*, *85*(9), 4258–4270. https://doi.org/10.1128/JVI.00220-11
Goodman, R. P., Ghabrial, S. A., Fichorova, R. N., & Nibert, M. L. (2011). Trichomonasvirus: A new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology*, *156*(1), 171–

179. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0832-8

Grybchuk, D., Kostygov, A. Y., Macedo, D. H., d'Avila-Levy, C. M., & Yurchenko, V. (2018). RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*(4), 1–7. https://doi.org/10.1590/0074-02760170487

Gurung, P., & Kanneganti, T.-D. (2016). Innate Immunity against Leishmania Infections. *Microbiol, Cell*, *17*(9), 1286–1294. https://doi.org/10.1111/cmi.12484.Innate

Hajjaran, H., Mahdi, M., Mohebali, M., Samimi-Rad, K., Ataei-Pirkooh, A., Kazemi-Rad, E., … Raoofian, R. (2016). Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species. *Archives of Virology*, *161*(12), 3385–3390. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3044-z

Hampl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B., & Roger, A. J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(10), 3859–3864. https://doi.org/10.1073/pnas.0807880106

Hartley, M.-A., Ronet, C., Zangger, H., Beverley, S. M., & Fasel, N. (2012). Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(July), 1–15. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00099

Haugland, O., Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Lindmo, K., Thu, B. J., Eliassen, T. M., … Evensen, O. (2011). Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (Salmo salar L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the Totiviridae Family. *Journal of Virology*, *85*(11), 5275–5286. https://doi.org/10.1128/JVI.02154-10

He, D., Pengtao, G., Ju, Y., Jianhua, L., He, L., Guocai, Z., & Xichen, Z. (2017). Differential protein expressions in virus-infected and uninfected trichomonas vaginalis. *Korean Journal of Parasitology*, *55*(2), 121–128. https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.2.121

Hernández, H. M., Marcet, R., & Sarracent, J. (2014). Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*, *21*, 54. https://doi.org/10.1051/parasite/2014054

Herrera, I. A. (2005). Giardiasis y desnutrición. *Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría*, *44*(3), 166–173. https://doi.org/10.22209/ia.n1a06

Hnida, J. a, & Duszynski, D. W. (1999). Taxonomy and phylogeny of some Eimeria (Apicomplexa:Eimeriidae) species of rodents as determined by polymerase chain reaction/restriction-fragment-length polymorphism analysis of 18S rDNA. *Parasitology Research*, *85*(11), 887–894. https://doi.org/10.1007/s004360050653

Ibáñez, E. A., Nogal, R. J. J., Pérez, S. J., Gómez, B. A., Escario, J. A., & Alderete, J. F. (2015). Sequestration of host-CD59 as potential immune evasion strategy of Trichomonas vaginalis. *Acta Tropica*, *149*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.003

Isawa, H., Kuwata, R., Hoshino, K., Tsuda, Y., Sakai, K., Watanabe, S., … Sawabe, K. (2011). Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from Culex mosquitoes in Japan. *Virus Research*, *155*(1), 147–155. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.013

Janssen, M. E. W., Takagi, Y., Parent, K. N., Cardone, G., Nibert, M. L., & Baker, T. S. (2015). Three-Dimensional Structure of a Protozoal Double-Stranded RNA Virus That Infects the Enteric Pathogen Giardia lamblia. *Journal of Virology*, *89*(2), 1182–1194. https://doi.org/10.1128/JVI.02745-14

Kariyawasam, R., Grewal, J., Lau, R., Purssell1, A., Valencia, B., Llanos-Cuentas, A., & Boggild, A. K. (2017). Influence of Leishmania RNA Virus-1 on Pro-Inflammatory Biomarker

Expression in a Human Macrophage Model of American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(7), 877–886. https://doi.org/10.1093/jas/sky047/4870008

Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 604–615. https://doi.org/10.1038/nrmicro2608

Khoshnan, A., & Alderete, J. F. (1994). Trichomonas vaginalis with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *Journal of Virology*, *68*(6), 4035–4038. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*, *479–480*, 2–25. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039

Lee, S., & Fernando, M. A. (1999). RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virus-like dsRNA in Eimeria maxima and E. necatrix of the domestic fowl. *Parasitology Research*, *85*(1), 25–29. https://doi.org/10.1007/s004360050502

Leitsch, D. (2016). Recent Advances in the Trichomonas vaginalis Field. *F1000Research*, *5*, 1–7. https://doi.org/10.12688/f1000research.7594.1

Li, L., Wang, A. L., & Wang, C. C. (2001). Structural Analysis of the − 1 Ribosomal Frameshift Elements in Giardiavirus mRNA Structural Analysis of the 𝔛 1 Ribosomal Frameshift Elements in Giardiavirus mRNA. *Journal of Virology*, *75*(22), 10612–10622. https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10612

Liu, H., Fu, Y., Li, B., Yu, X., Xie, J., Cheng, J., … Li, G. (2011). Widespread Horizontal Gene Transfer from Circular Single-stranded DNA Viruses to Eukaryotic Genomes. *BMC Evolutionary Biology*, *216*(11), 1–15. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-276

López, O. E., & Serrano, L. G. (2005). El maravilloso mundo de los protozoarios. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, *2*(1), 231–237.

Lujan, H. D. (2006). Articulo Especial Giardia Y Giardiasis. *Medicina*, *66*(1), 70–74.

Machado, A. J. E., García, B. S., & Medina, M. D. A. (2016). Leishmaniasis mucosa en un lactante. Una presentación inusual de una enfermedad olvidada. *Infectio*, *20*(3), 165–168. https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.06.004

Maga, J. a, Widmer, G., & LeBowitz, J. H. (1995). Leishmania RNA virus 1-mediated cap-independent translation. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(9), 4884–4889. https://doi.org/10.1128/MCB.15.9.4884

Maia, C., Alwassouf, S., Cristóvão, J. M., Ayhan, N., Pereira, A., Charrel, R. N., & Campino, L. (2017). Serological association between Leishmania infantum and sand fly fever Sicilian (but not Toscana) virus in sheltered dogs from southern Portugal. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2023-x

Mancheno, V. A., Cabezas, A. J., Sacoto, A. K., Arenas, G. R., Gea, G. Q. M., Mancheno, V. P., … Sierra, Q. A. (2015). Caso clínico: leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) GACETA MÉDICA DE MÉXICO CASO CLÍNICO, (Lcd), 251–254. Retrieved from https://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n2/GMM_153_2017_2_251-254.pdf

Marche, S., Roth, C., Manohar, S. K., Dollet, M., & Baltz, T. (1993). RNA virus-like particles in pathogenic plant trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *57*(2), 261–268. https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90202-9

Mielczarek, E., & Blaszkowska, J. (2016). Trichomonas vaginalis: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection*, *44*(4), 447–458. https://doi.org/10.1007/s15010-

015-0860-0
Miska, K. B., Jenkins, M. C., Trout, J. M., Santín, M., & Fayer, R. (2009). Detection and comparison of Giardia virus (GLV) from different assemblages of Giardia duodenalis. *The Journal of Parasitology*, *95*(5), 1197–1200. https://doi.org/10.1645/GE-1876.1
Morales, O. A. (2002). Fundamentos de la investigación documental y la monografía. *Departamento de Investigación Facultad de Odontología*, *6*(1), 1–14.
Moreira, V. R., de Jesus, L. C. L., Soares, R.-E. P., Silva, L. D. M., Pinto, B. A. S., Melo, M. N., … Pereira, S. R. F. (2017). Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by Leishmania (Leishmania) infantum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(6), e02360-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16
Nibert, M. L., Bruenn, J. A., Ghabrial, A., Mizutani, T., Patterson, J. L., Roossinck, M. J., … Wickner, R. B. (2013). Reconsideration of existing species in genus Leishmaniavirus, family Totiviridae. *Totiviridae Study Group*, (June), 1–9.
Novák, L., Zubáčová, Z., Karnkowska, A., Kolisko, M., Hroudová, M., Stairs, C. W., … Hampl, V. (2016). Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12862-016-0771-4
Oddó, B. (2006). Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*, *23*(3), 200–214. https://doi.org/10.4067/S0716-10182006000300002
Parent, K. N., Takagi, Y., Cardone, G., Olson, N. H., Ericsson, M., Yang, M., … Nibert, M. L. (2013). Structure of a protozoan virus from the human genitourinary parasite Trichomonas vaginalis. *MBio*, *4*(2). https://doi.org/10.1128/mBio.00056-13
Petit, F., Vilchez, V., Torres, G., Molina, O., Dorfman, S., Mora, E., & Cardozo, J. (2006). Meningoencefalitis amebiana primaria: Comunicacion de dos nuevos casos Venezolanos. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *64*(4), 1043–1046. https://doi.org/10.1590/S0004-282X2006000600034
Pott, J., Stockinger, S., Torow, N., Smoczek, A., Lindner, C., McInerney, G., … Hornef, M. W. (2012). Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS Pathogens*, *8*(5). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002670
Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Bonami, J. R., & Lightner, D. V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, *87*(4), 987–996. https://doi.org/10.1099/vir.0.81127-0
Provenzano, D., & Alderete, J. F. (1995). Analysis of Human Immunoglobulin-Degrading Cysteine Proteinases of Trichomonas-Vaginalis. *Infection and Immunity*, *63*(9), 3388–3395.
Radek, R. (1994). Monocercomonoides termitis n. sp., an Oxymonad from the Lower Termite Kalotermes sinaicus. *Archiv Fur Protistenkunde*, *144*(4), 373–382. https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80240-X
Rivero, M. R., Jausoro, I., Bisbal, M., Feliziani, C., Lanfredi-Rangel, A., & Touz, M. C. (2013). Receptor-mediated endocytosis and trafficking between endosomal-lysosomal vacuoles in Giardia lamblia. *Parasitology Research*, *112*(4), 1813–1818. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3253-7
Roditi, I., Wyler, T., Smith, N., & Braun, R. (1994). Virus-like particles in Eimeria nieschulzi are associated with multiple RNA segments. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *63*(2), 275–282. https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90063-9

Romero, T. J. O., Frank, M. N., Cervantes, B. R., Cadena, L. J. F., Montij, -Barrios Ericka, Zárate, M. F., … Ramírez, M. J. (2012). Redalyc.Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex*, *33(4)*, 207–214.

Rossi, M., Castiglioni, P., Hartley, M.-A., Eren, R. O., Prével, F., Desponds, C., … Fasel, N. (2017). Type I interferons induced by endogenous or exogenous viral infections promote metastasis and relapse of leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(19), 4987–4992. https://doi.org/10.1073/pnas.1621447114

Salinas, G., Zamora, M., Stuart, K., & Saravia, N. (1996). Leishmania RNA Viruses in Leishmania of the Viannia Subgenus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *54*(4), 425–429. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.425

Santos, D. I. (2014). Tricomoniasis: Una vision amplia. *Iatreia*, *27*(2), 198–205.

Scheffter, S. M., Ro, Y. T., Chung, I. K., & Patterson, J. L. (1995). The Complete Sequence of Leishmania RNA Virus LRV2-1, a Virus of an Old World Parasite Strain. *Virology*, *212*(1), 84–90. https://doi.org/10.1006/VIRO.1995.1456

Simpson, A. G. B., Inagaki, Y., & Roger, A. J. (2006). Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(3), 615–625. https://doi.org/10.1093/molbev/msj068

Stark, J. R., Judson, G., Alderete, J. F., Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Giovannucci, E. L., … Mucci, L. A. (2009). Prospective study of trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(20), 1406–1411. https://doi.org/10.1093/jnci/djp306

Stuart, K. D., Weeks, R., Guilbride, L., & Myler, P. J. (1992). Molecular organization of Leishmania RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(18), 8596–8600. https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8596

Sutcliffe, S., Neace, C., Magnuson, N. S., Reeves, R., & Alderete, J. F. (2012). Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis-A Proposed Molecular Mechanism. *PLoS Pathogens*, *8*(8), 1–4. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002801

Tirera, S., Ginouves, M., Donato, D., Caballero, I. S., Bouchier, C., Lavergne, A., … Lacoste, V. (2017). Unraveling the genetic diversity and phylogeny of Leishmania RNA virus 1 strains of infected Leishmania isolates circulating in French Guiana. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764

Vásquez, M., Rodríguez, J., Lira, B., Cueva, S., Ayón, M., & Mallma, Y. (2012). Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *23*(1), 20–26.

Wang, A. L., & Wang, C. C. (1991). Viruses of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, *7*(4), 76–80. https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90198-W

Wang, L., Zhang, J., Zhang, H., Qiu, D., & Guo, L. (2016). Two novel relative double-stranded RNA mycoviruses infecting Fusarium poae strain SX63. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(5), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijms17050641

Wickner, R.B., Ghabrial, S.A., Nibert, M.L., Patterson, J. L. and W. (2012). *Totiviridae*. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* https://doi.org/10.1016/B978-0-12-249951-7.50001-8

Wu, B., Zhang, X., Gong, P., Li, M., Ding, H., Xin, C., … Li, J. (2016). Eimeria tenella: a novel dsRNA virus in E. tenella and its complete genome sequence analysis. *Virus Genes*, *52*(2), 244–252. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1295-0

Xie, J., Havens, W. M., Lin, Y. H., Suzuki, N., & Ghabrial, S. A. (2016). Reprint of "The

victorivirus Helminthosporium victoriae virus 190S is the primary cause of disease/hypovirulence in its natural host and a heterologous host." *Virus Research*, *219*, 100–107. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.010

Xin, C., Wu, B., Li, J., Gong, P., Yang, J., Li, H., … Zhang, X. (2016). Complete genome sequence and evolution analysis of Eimeria stiedai RNA virus 1, a novel member of the family Totiviridae. *Archives of Virology*, *161*(12), 3571–3576. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3020-7

Yang, X., Zhang, Y., Ge, X., Yuan, J., & Shi, Z. (2012). A novel totivirus-like virus isolated from bat guano. *Archives of Virology*, *157*(6), 1093–1099. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1278-y

Zangger, H., Hailu, A., Desponds, C., Lye, L. F., Akopyants, N. S., Dobson, D. E., … Fasel, N. (2014). Leishmania aethiopica Field Isolates Bearing an Endosymbiontic dsRNA Virus Induce Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(4), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002836

Zerpa, O., & Convit, J. (2009). Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela. *Bahia*, *79*(3), 30–34. Retrieved from www.gmbahia.ufba.br

Zhai, Y., Attoui, H., Jaafar, F. M., Wang, H. Q., Cao, Y. X., Fan, S. P., … Liang, G. (2010). Isolation and full-length sequence analysis of Armigeres subalbatus totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae. *Journal of General Virology*, *91*(11), 2836–2845. https://doi.org/10.1099/vir.0.024794-0