JAQUES FRANCO DE CARVALHO JUNIOR

**O transportador ABC de *Trypanosoma cruzi* TcABCG1
potencialmente envolvido na resistência a benznidazol:
características e filogenia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Pátogeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

JAQUES FRANCO DE CARVALHO JUNIOR

**O transportador ABC de *Trypanosoma cruzi* TcABCG1
potencialmente envolvido na resistência a benznidazol:
características e filogenia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Pátogeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Pátogeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Carvalho Junior, Jaques Franco de.

O transportador ABC de *Trypanosoma cruzi* TcABCG1
potencialmente envolvido na resistência a benznidazol: características e
filogenia / Jaques Franco de Carvalho Junior. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Transportador ABC e resistência a benznidazol em
Trypanosoma cruzi.

Versão do título para o inglês: The ABC transporter of *Trypanosoma
cruzi* TcABCG1 potentially involved in benznidazole resistance:
characteristics and phylogeny.

1. Transportador ABC 2. Resistência a benznidazol 3. Cepas de
Trypanosoma cruzi 4. Filogenia I. Zingales, Profa. Dra. Bianca
Silvana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0221/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jaques Franco de Carvalho Junior.

Título da Dissertação: O transportador ABC de *Trypanosoma cruzi* TcABCG1 potencialmente envolvido na resistência a benznidazol: características e filogenia.

Orientador(a): Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **004** nas fls. **02** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Bianca Silvana Zingales**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Transportadores ABC e MATE: potenciais elementos de resistência a drogas em Trypanosoma cruzi*" do qual participam o(s) aluno(s), **Jacques Franco de Carvalho Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **28.02.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 28 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-900 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 578/13 referente ao projeto intitulado: *"Transportadores ABC e MATE: potenciais elementos de resistência a drogas em Trypanosoma cruzi"* sob a responsabilidade de Jacques Franco de Carvalho Junior , foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 28 de fevereiro de 2013.

P/

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esse trabalho às pessoas que direta e indiretamente me ajudaram na árdua trajetória do curso, à minha mãe, Vera Lúcia Boechat Faria e à minha noiva, Adriana Lemos de Novaes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus que permitiu que eu fizesse o curso e que ilumina com amor, misericórdia, proteção, conhecimento e sabedoria cada passo de minha vida;

os meus agradecimentos especiais à Professora Doutora Bianca Zingales, que conduziu os trabalhos de orientação desse projeto;

aos Professores Renata Carmona e Ferreira, Marcelo Briones, Carlos Eduardo Winter, Ariel Mariano Silber e Renato Mortara;

ao pessoal do laboratório, Marcelo Nunes Silva, Susan lenne da Silva Vançan, Solange Lessa Nunes, Rafael Aquino de Araújo e Mariana Bury;

aos doutorandos do curso, colegas e técnicos responsáveis pelos laboratórios da Universidade de São Paulo, pela colaboração nos experimentos: Manoel Aparecido Peres, Célia Ludio, Chrislaine Oliveira Soares, Luci Deise Navarro e Raíssa Melo;

à Secretária Silvia Ferreira Camargo do Instituto de Ciências Biomédica da USP;

à Igreja Presbiteriana Butantã pela acolhida na casa do estudante no período do curso, nas pessoas do Pastor Marcelo Smargiasse e do Pastor Ademir Aguiar;

aos amigos da Casa do Estudante, em especial ao Juliano de Moraes Ferreira Silva, pelos aconselhamentos espirituais e vivência na metrópole São Paulo;

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa de estudos.

“ [...] o espírito se torna leão,
quer capturar a liberdade e ser senhor em seu próprio deserto [...] ”

Zaratustra

RESUMO

Carvalho Junior JF. O transportador ABC de *Trypanosoma cruzi* TcABCG1 potencialmente envolvido na resistência a benznidazol: características e filogenia. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que afeta 7,7 a 10 milhões de pessoas. O *T. cruzi* apresenta grande diversidade genética. Atualmente as cepas do parasita estão divididas em unidades discretas de tipagem (DTUs), designadas TcI–TcVI. Foi identificado um grupo adicional de isolados de morcegos, denominado Tcbat. Apenas dois fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença Chagas: benznidazol (BZ) e nifurtimox (NFX). Ambos causam efeitos colaterais frequentes e apresentam eficácia limitada na fase crônica da doença. As razões para as falhas terapêuticas são desconhecidas, embora tenham sido atribuídas majoritariamente a diferenças na suscetibilidade aos fármacos entre as cepas do *T. cruzi*. Evidências experimentais de vários laboratórios atestam que BZ e NFX exibem atividade divergente contra diferentes cepas. Resultados prévios de nosso grupo indicam que o gene de um transportador ABC (*ATP Binding Cassette*) da subfamília G, denominado TcABCG1, encontra-se super expresso em cepas resistentes a BZ. Transportadores ABC atuam na translocação de uma variedade de metabólitos e de xenobióticos através de membranas. Além disto, certos transportadores ABC estão envolvidos no fenômeno de resistência a drogas em muitos organismos. O objetivo central do presente estudo foi caracterizar o gene TcABCG1 em cepas pertencentes a diferentes DTUs e cuja suscetibilidade a BZ foi definida. A sequência do gene de cópia única TcABCG1 (1.998 pb) de 14 cepas foi determinada. Observamos algumas variações de aminoácidos não sinônimas na proteína ABC entre as cepas. No entanto, estas não puderam ser associadas ao fenótipo de resistência a BZ. Análises genealógicas de TcABCG1 mostraram quatro clados que correspondem às DTUs TcI, TcII, TcIII e a Tcbat. Os dois haplótipos das cepas híbridas TcV e TcVI agruparam com os clados TcII e TcIII. As sequências de Tcbat ficaram próximas a TcI. Eventos de recombinação nos haplótipos de TcABCG1 de cepas híbridas foram inferidos pela análise de *bootscan*/RDP. Essa abordagem apoiou o modelo de “Duas Hibridizações” para a origem das DTUs híbridas. A localização subcelular do transportador TcABCG1 foi investigada utilizando-se um antisoro contra a proteína recombinante derivada de uma região do transportador. A análise por imunofluorescência indireta em formas epimastigotas indica que TcABCG1 está localizado majoritariamente em vesículas intracelulares. A determinação da abundância da proteína do transportador TcABCG1 em cepas resistentes a BZ deverá auxiliar no entendimento da participação desta molécula na resistência ao fármaco.

Palavras-chave: Transportador ABC. Resistência a benznidazol. Cepas de *Trypanosoma cruzi*. Filogenia.

ABSTRACT

Carvalho Junior JF. The ABC transporter of *Trypanosoma cruzi* TcABCG1 potentially involved in benznidazole resistance: characteristics and phylogeny. [Dissertation (MSc in Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, which affects 7.7 to 10 million people. *T. cruzi* displays high genotypic diversity. Currently the parasite strains are classified into six discrete typing units (DTUs), designated as TcI–TcVI. An additional group of isolates from bats, Tcbat, has been identified. Only two drugs are available for Chagas disease treatment, benznidazole (BZ) and nifurtimox (NFX). Both drugs frequently cause severe side effects and have limited efficacy in the chronic phase of the disease. The reasons for treatment failures are unknown. Yet, they have been attributed mostly to differences in drug susceptibility among *T. cruzi* strains. Experimental evidence from several laboratories has shown that BZ and NFX exhibit divergent activities against different strains. Previous data from our group indicate that one ATP Binding Cassette (ABC) transporter gene of the G subfamily, named *TcABCG1*, is overexpressed in BZ-resistant strains. ABC transporters mediate translocation of a wide variety of metabolites and xenobiotics across membranes. In addition, selected ABC transporters have been related to drug resistance in many organisms. The central goal of the present study was to characterize *TcABCG1* gene in strains belonging to different DTUs and of defined BZ susceptibility. *TcABCG1* single copy gene sequence (1,998 bp) of 14 strains was determined. Few non-synonymous amino acid substitutions were detected in the ABC transporter protein among the strains, which could not be associated to the BZ-resistance phenotype. Genealogic analyses of *TcABCG1* showed four distinct clades corresponding to TcI, TcII, TcIII and Tcbat. The two haplotypes of TcV and TcVI hybrid strains clustered with TcII and TcIII clades. Tcbat sequences localized closer to TcI. Recombination events in *TcABCG1* hybrid haplotypes were inferred by bootscan/RDP analysis. This approach supported the “Two-Hybridization” model for the origin of hybrid DTUs. The subcellular localization of *TcABCG1* transporter was investigated employing an antiserum to a recombinant protein derived from a specific region of this molecule. Indirect immunofluorescence analysis in epimastigote forms indicated that *TcABCG1* is mostly localized to intracellular vesicles. Determination of the abundance of the *TcABCG1* transporter protein in BZ-resistant strains may shed light on the involvement of this molecule in drug resistance.

Keywords: ABC transporter. Benznidazole resistance. *Trypanosoma cruzi* strains. Phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 2	Tipagem molecular de isolados de <i>T. cruzi</i>	26
Figura 3	Distribuição geográfica aproximada das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre.....	28
Figura 4	Modelos de (A) Duas Híbridizações e (B) Três Ancestrais para explicar a origem das DTUs híbridas.....	30
Figura 5	Produtos da amplificação do domínio D7 do rDNA 24Sα.....	31
Figura 6	Estrutura química do Nifurtimox (A) e Benznidazol (B).....	32
Figura 7	Transportador ABC (<i>ATP Binding Cassette</i>).....	36
Figura 8	Representação esquemática da estrutura de transportadores ABC.....	38
Figura 9	Transportadores ABC da subfamília G.....	40
Figura 10	Abundância relativa de transcritos do gene <i>TcABCG1</i>	43
Figura 11	Localização dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	51
Figura 12	Mapa do vetor pQE-30 Xa. Extraído do manual da Qiagen®.....	54
Figura 13	Localização dos domínios Walker A e B, assinatura ABC e regiões transmembrânicas das seis alfa hélices na sequência proteica do haplótipo NEsmo de <i>TcABCG1</i>	60
Figura 14	Estrutura putativa do transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 15	Alinhamento de aminoácidos dos haplótipos NEsmo (XP_818614) e Esmo (XP_806666.1) de <i>TcABCG1</i> de CL Brener.....	61
Figura 16	Árvore gerada pelo método de neighbour-joining com a sequência nucleotídica do gene <i>TcABCG1</i> de 14 cepas de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 17	Árvore gerada pelo método máxima verossimilhança com a sequência nucleotídica do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	64

Figura 18	Genealogia em rede da sequência nucleotídica do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 19	Análise de recombinação intragênica no gene <i>TcABCG1</i> das cepas.....	66
Figura 20	Análise de recombinação intragênica no haplótipo A da cepa SO3 cl5 pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3.....	67
Figura 21	Análise de recombinação intragênica no haplótipo B da cepa SO3 cl5 pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3.....	67
Figura 22	Análise de recombinação intragênica nos haplótipos Esmo e NEsmo de CL Brener pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3.....	68
Figura 23	Análise de recombinação intragênica no gene <i>TcABCG1</i> de Tcbat pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3.....	69
Figura 24	Variação da sequência nucleotídica do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	72
Figura 25	Alinhamento de aminoácidos do transportador <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	74
Figura 26	Expressão da proteína recombinante de uma região do gene <i>TcABCG1</i> , clonada em dois vetores de expressão.....	76
Figura 27	Expressão da proteína recombinante de uma região do gene <i>TcABCG1</i> clonada no vetor de expressão pQE-30Xa (Quiagen®).....	76
Figura 28	Western blot. Reconhecimento de antígenos de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1 por soros imunes de camundongo.....	77
Figura 29	Imunofluorescência indireta de formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro anti-proteína recombinante derivada de uma região de <i>TcABCG1</i> (diluição 1:80).....	78

Figura 30	Imunofluorescência indireta de formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro normal (painel superior) e soro anti-epimastigotas (painel inferior). (diluição 1:80).....	79
Figura 31	Localização subcelular de <i>TcABCG1</i> em formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro anti-proteína recombinante (diluição 1:80). microscopia confocal.....	80
Figura 32	Árvore gerada pelo método de <i>neighbour-joining</i> com a sequência proteica completa dos transportadores ABC da subfamília G de humanos ABCG1 (P45844), ABCG2 (AAP44087), ABCG4 (NP_071452.2), ABCG5 (NP_071881), ABCG8 (NP_071882.1) e o transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i> (haplótipo Esmo).....	84
Figura 33	Análise de recombinação intragênica na sequência parcial do gene da latosterol redutase de <i>Tcbat</i> pelo método de <i>Bootscan</i> manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais.....	87
Figura 34	Árvore gerada pelo método de <i>neighbour-joining</i> com a sequência de aminoácidos do NBD do transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i> e de transportadores da subfamília G de outros tripanossomatídeos.....	89
Figura 35	Árvore gerada pelo método da máxima parcimônia com a sequência de aminoácidos do NBD do transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i> e de transportadores da subfamília G de outros tripanossomatídeos.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correspondências entre DTUs atuais e nomenclaturas anteriores.....	27
Tabela 2	Lista das quinze primeiras sequências com maior similaridade com a sequência proteica completa de <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i>	44
Tabela 3	Características das cepas utilizadas neste estudo.....	47
Tabela 4	Características dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	51
Tabela 5	Sensibilidade a BZ de cepas de <i>T. cruzi</i> : valores e porcentagens de cura.....	58
Tabela 6	Números de acesso do Genbank das sequências nucleotídicas e proteicas dos haplótipos de <i>TcABCG1</i>	59
Tabela 7	Posições de elementos/domínios na sequência proteica do haplótipo NEsmo de <i>TcABCG1</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
μL	Microlitros
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BZ	Benznidazol
CI_{50}	Concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50%
Cys	Cisteína
Cytb	Citocromo b
DHFR-TS	Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintetase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
dNTP	Desoxirribonucleosídeo Trifosfato
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
Esmo	Haplótipo Esmeraldo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FX	Fexinidazol
gGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kb	Kilobases
LB	Luria Bertani
LIB	<i>Liver Infusion Broth</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
Mb	Megabases
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
ME	Mini-exon
mL	Mililitros
MLEE	<i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>

NEsmo	Haplótipo Não-Esmeraldo
NFX	Nifurtimox
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGP	Glicoproteína-P
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
rDNA	DNA codificador de RNA ribossômico
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SL	<i>Spliced Leader</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
SSU rRNA	Small Subunit rRNA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBS	Tris-Borato-Salina
TE	Tris-EDTA
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
TR	Tripanotiona redutase
TRS	<i>Technical Report Series</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

AMINOÁCIDOS

Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	21
1.1.1	A História.....	21
1.1.2	A doença de Chagas.....	21
1.1.3	O parasita.....	22
1.1.4	As vias de transmissão.....	24
1.2	Diversidade genética do <i>T. cruzi</i>	24
1.2.1	Classificação atual dos grupos de <i>T. cruzi</i>	27
1.2.2	Características eco-epidemiológicas das DTUs.....	28
1.2.3	Dois modelos principais para a origem das DTUs híbridas.....	29
1.2.4	<i>T. cruzi</i> em morcegos – Tcbat.....	30
1.3	Quimioterapia para a doença de Chagas	32
1.3.1	A eficácia do tratamento e suscetibilidade de cepas de <i>T. cruzi</i> aos quimioterápicos.....	33
1.3.2	Novos fármacos para a doença de Chagas.....	34
1.4	Os transportadores ABC.....	35
1.5	Transportadores ABC da subfamília G (ABCG).....	39
1.5.1	Transportadores ABCG humanos.....	39
1.5.2	Transportadores ABCG de tripanossomatídeos patogênicos.....	41
1.5.3	O transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i>	42
2	OBJETIVOS.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Meios e Soluções.....	46
3.2	Cepas de <i>T. cruzi</i>	46
3.3	Determinação da suscetibilidade a BZ.....	47
3.4	Clonagem e sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	48
3.4.1	Extração do DNA.....	48
3.4.2	Amplificação do gene <i>TcABCG1</i>	48
3.4.3	Purificação do produto de PCR.....	48
3.4.4	Adição de nucleotídeos de adenina ao produto de PCR.....	49
3.4.5	Ligação ao vetor de clonagem.....	49

3.4.6	A transformação em bactérias competentes DH5α.....	49
3.4.7	PCR de colônia.....	50
3.4.8	Purificação de DNA plasmidial.....	50
3.5	Sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	50
3.5.1	Análise e alinhamento das sequências.....	52
3.6	Reconstrução de genealogias.....	52
3.7	Análise da recombinação intragênica.....	53
3.8	Clonagem e expressão do gene <i>TcABCG1</i> no vetor pQE-30 Xa.....	53
3.8.1	Clonagem de uma região do gene <i>TcABCG1</i>	53
3.8.2	Expressão da proteína clonada no vetor pQE-30 Xa	54
3.8.3	Purificação da proteína recombinante.....	54
3.8.4	Purificação dos corpos de inclusão.....	55
3.9	Obtenção de anticorpos.....	55
3.10	Imunofluorescência indireta.....	56
3.11	Western blot.....	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Determinação da suscetibilidade a BZ.....	58
4.2	A estrutura putativa do transportador <i>TcABCG1</i>	59
4.3	Comparação da sequência primária da proteína codificada pelos haplótipos NEsmo e Esmo da <i>TcABCG1</i>	61
4.4	Clonagem e sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	62
4.5	Genealogia de <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	62
4.6	Eventos de recombinação intragênica no gene <i>TcABCG1</i> de cepas consideradas híbridas.....	66
4.7	A busca de polimorfismos de nucleotídeo único potencialmente associados ao fenótipo de resistência a BZ.....	69
4.8	Caracterização da localização celular do transportador <i>TcABCG1</i>	75
4.8.1	Obtenção de proteína recombinante.....	75
4.8.2	Obtenção de antissoros.....	77
4.8.3	Análise do reconhecimento de antígenos por Western Blot.....	77
4.8.4	Localização subcelular do transportador <i>TcABCG1</i>	78
5	DISCUSSÃO	81
5.1	O Transportador <i>TcABCG1</i>	81

5.2	Ortólogos de <i>TcABCG1</i> em tripanossomatídios.....	88
6	REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE - Sequência nucleotídica do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>		104

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

1.1.1 A História

Em 1909 Carlos Chagas foi enviado pelo Instituto Oswaldo Cruz para a pequena cidade de Lassance, no norte de Minas Gerais, próxima ao Rio São Francisco, para combater um surto de malária entre trabalhadores da construção da estrada de ferro, antiga Ferrovia Central do Brasil. Carlos Chagas observou que as casas da região estavam infestadas com um inseto hematófago grande do gênero *Triatoma*. No intestino destes insetos, Carlos Chagas descobriu a presença de protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma*, que, experimentalmente, eram transmitidos para macacos pela picada de insetos infectados.

Carlos Chagas denominou esse novo parasita *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a seu orientador do curso de doutoramento e amigo pessoal, Oswaldo Cruz (Chagas, 1909). Chagas suspeitou que o parasita pudesse causar alguma doença em humanos. Assim, em 23 de abril de 1909, ao retirar uma amostra de sangue de uma criança doente de três anos de idade, observou a presença de flagelados. Chagas e colaboradores rapidamente descreveram as características básicas do ciclo do parasita, as espécies de vetores e reservatórios silvestres e as manifestações clínicas da doença, que, como justo tributo, recebeu o nome de doença de Chagas.

Em curto espaço de tempo, Carlos Chagas descreveu 27 casos de formas agudas da doença e executou mais de 100 autópsias de pacientes que exibiam a forma crônica. Por duas vezes ele foi indicado para receber o Prêmio Nobel, o que, lamentavelmente, nunca ocorreu.

1.1.2 A doença de Chagas

Estima-se que de 7,7 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* e que 10.000 a 14.000 mortes anuais sejam causadas pela doença de Chagas (WHO, 2010). As maiores prevalências são verificadas na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%) (Rassi et al., 2012). No entanto, em países onde a prevalência é de cerca 1% (Brasil e México),

juntamente com a Argentina, vive mais de 60% dos infectados (Rassi et al., 2010). Em função das migrações a doença de Chagas passou a ser uma preocupação global.

A doença se apresenta em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda corresponde ao período inicial da infecção, sendo assintomática na maior parte dos pacientes. Esta fase define-se basicamente pela parasitemia elevada, detectável em exames parasitológicos diretos no sangue. Cerca de 2% dos indivíduos apresentam febre de intensidade variável, aumento do fígado, baço e linfonodos e edema subcutâneo localizado ou generalizado.

A fase crônica inicia-se entre 2 a 3 meses após a fase aguda. Cerca de 60% a 70% dos pacientes terão a forma indeterminada da doença de Chagas, que não apresenta sintomas clínicos. Aproximadamente 20% a 30% dos indivíduos evoluem para a forma cardíaca, caracterizada por anomalias no sistema de condução do coração, arritmias, aneurismas apicais, tromboembolismo e morte súbita (Rassi et al., 2012). A forma digestiva, observada em cerca de 10% dos pacientes na fase crônica, é caracterizada por alterações nas funções motoras, secretoras e de absorção do esôfago e do trato gastrointestinal (Rassi et al., 2010). Alguns pacientes apresentam a forma cardiodigestiva, que é a combinação da doença cardíaca com megacólon e/ou megaesôfago. Nesses pacientes, via de regra, o megaesôfago precede a forma cardíaca e o megacólon.

Há diferenças geográficas na prevalência da forma digestiva e cardiodigestiva, que ocorrem, predominantemente, no Chile e no Brasil Central, sendo praticamente ausentes em países ao norte da Amazônia. Tais diferenças podem estar relacionadas com a diversidade genética das cepas circulantes e/ou com características genéticas e imunológicas das populações infectadas.

1.1.3 O parasita

O *T. cruzi* é um parasita digenético, que tem insetos triatomíneos da família Reduviidae, subfamília Triatominae (popularmente denominados de barbeiros), como hospedeiros intermediários, e cerca de 150 espécies de mamíferos, como hospedeiros definitivos. As espécies de triatomínios *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *T. dimidiata* são os principais vetores da transmissão de *T. cruzi* ao homem.

O parasita apresenta três formas evolutivas distintas que são nomeadas de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a disposição do flagelo: o epimastigota, forma flagelada, não infectante, que se multiplica no tubo digestivo do inseto; o tripomastigota, forma flagelada, infectante e não replicativa, presente no vetor e nos hospedeiros mamíferos; e o amastigota, forma com pequeno flagelo intracelular, possivelmente infectante, que se multiplica no interior da célula do mamífero (Brenner, 1973).

A forma infectante encontrada no inseto é denominada tripomastigota metacíclico e é liberada por ocasião da picada, juntamente com as fezes. O parasita não penetra a pele intacta, somente infectando o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele. As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir os primeiros tipos celulares que encontram, que podem ser macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. No interior das células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas que se multiplicam em divisões binárias sucessivas. Os amastigotas vão se diferenciando em tripomastigotas e, após ruptura celular, podem atingir a corrente circulatória e invadir os diferentes tipos celulares ou serem ingeridos por um inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo. No vetor, transformam-se em epimastigotas que se multiplicam no tubo digestivo. Na porção terminal do aparato digestório, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que estão aptos a contaminar outros hospedeiros (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Extraído de Expert Reviews in Molecular Medicine: [http:// www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/0200412X](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/0200412X).

1.1.4 As vias de transmissão

As principais vias de transmissão do *T. cruzi* são a vetorial e por transfusão sanguínea. A transmissão congênita e a infecção oral com alimentos contaminados são também importantes. Nas últimas quatro décadas, as iniciativas multinacionais para o controle da transmissão vetorial e transfusional reduziram consideravelmente a incidência da doença de Chagas. Receberam o certificado de interrupção da transmissão: Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil em 2006. Já nos países andinos e da América Central, os programas de controle estão em andamento. Como resultado desses programas, a prevalência da doença de Chagas foi reduzida aproximadamente de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas em 1990, para 7,7 a 10 milhões nos dias atuais.

A transmissão congênita ou transplacentária pode ocorrer em qualquer período de gestação, com maior frequência no último trimestre, ou durante o parto. Recentemente, vários relatos descreveram microepidemias e surtos de doença de Chagas aguda em algumas regiões do Brasil, Venezuela e Colômbia, atribuídas a infecção oral (revisto por Yoshida, 2008).

1.2 Diversidade genética do *T. cruzi*

T. cruzi é um complexo de isolados que apresentam diferenças biológicas, bioquímicas e imunológicas. Segundo alguns autores, essa diversidade pode estar associada à sua necessidade de adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros (Brener et al., 1999).

Neste ponto é importante esclarecer a nomenclatura utilizada pela comunidade científica que trabalha com *T. cruzi* (Lumsden et al., 1973). Denominam-se: isolados primários, as populações de parasitas que são obtidas de hospedeiros mamíferos e/ou insetos vetores e que são transferidas em condições artificiais de manutenção em laboratório; estoque, uma população derivada de um isolado primário, cujas propriedades não foram estudadas, e que não é necessariamente idêntica ao isolado primário, pois durante o cultivo pode ocorrer uma seleção de populações; cepas, são populações mantidas em laboratório por passagens seriadas em cultura ou em animais experimentais com parâmetros biológicos e/ou bioquímicos e/ou imunológicos estabelecidos, constituídas por uma mistura

heterogênea de genótipos (população policlonal) ou apenas um componente populacional (população monoclonal); clone, uma população derivada de um único organismo, a partir de uma cepa. Os clones individuais são obtidos a partir de cepas por processos de clonagem em placas de agar-LIT, por diluição limitante ou por separação em FACS (*fluorescence-activated cell sorter*).

Estudos de genética de população forneceram evidências convincentes de que *T. cruzi* é um organismo diplóide, que possui uma estrutura populacional clonal (Tibayrenc et al., 1986), na qual diferentes clones evoluíram por reprodução clonal (fissão binária) a partir de um ancestral comum. O fato de *T. cruzi* ser basicamente uma espécie clonal não exclui eventos de recombinação entre populações naturais, uma vez que os genótipos resultantes continuam se perpetuando por reprodução clonal (Zingales et al., 2012).

Com base na análise do perfil eletroforético de isoenzimas, as cepas de *T. cruzi* foram reunidas em três grupos principais, denominados zimodemas (Miles et al., 1978; 1980). A análise subsequente de um número maior de loci genéticos em um número maior de cepas ampliou a diversidade para 43 zimodemas (Tibayrenc, Ayala, 1988). A diversidade genética do parasita foi corroborada por análises de RAPD ("randomly amplified polymorphic DNA"), RFLP ("restriction fragment lenght polymorphism"), impressões digitais de DNA ("DNA fingerprinting"), microssatélites e cariótipo molecular (revisto em Zingales et al., 1999; Zingales, 2011).

Diferentes marcadores moleculares, tais como: o dimorfismo do domínio D7 do gene de rRNA 24S α e da região intergênica do gene de mini-éxon (Souto et al., 1996; Zingales e Souto, 1993); os dados de MLEE ("Eletoforese de Enzimas Multilocos") e a RAPD (Tibayrenc, 1995); e a atividade do promotor de rDNA (Floeter-Winter et al., 1997); dentre outros, revelaram a existência de dois grupos principais no taxon *T. cruzi*. Esses grupos receberam diferentes denominações pelos pesquisadores que os descreveram. Em 1999, num esforço para homogeneizar a nomenclatura, os dois grupos foram denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, por consenso do Comitê de Expertos (Anônimo, 1999). O comitê não atribuiu nenhuma classificação a cepas híbridas e do Zimodema 3 e recomendou que estudos adicionais fossem realizados para melhor caracterizar esses organismos.

A relevância epidemiológica da divisão de *T. cruzi* em dois grupos foi investigada, inicialmente, em países do Cone Sul, utilizando ensaios simples de amplificação por PCR do DNA dos isolados (Souto e Zingales, 1993; Souto et al.,

1996). Nesses ensaios, a amplificação do domínio D7 do rDNA 24S α gera dois amplicons: 110 pb para *T. cruzi* I; 125 pb para *T. cruzi* II; e ambos os produtos nas cepas híbridas. A amplificação da região intergênica do gene de mini-exon também gera dois produtos: 350 pb para *T. cruzi* I e 300 pb para *T. cruzi* II. Nas cepas híbridas o produto de 300 pb é obtido (Figura 2).

Figura 2 - Tipagem molecular de isolados de *T. cruzi*. PCR dirigida para o domínio D7 do 24S α rDNA e espaçador intergênico do gene de mini-exon (ME). Grupo TcI: 110 pb rDNA; 350 pb ME; Grupo TcII: 125 pb rDNA; 300 pb ME; Híbrido (H): 110 e 125 pb rDNA; 300 pb ME. Iniciadores da PCR: setas vermelhas (Souto et al., 1996). (Extraído de Zingales, 2011).

Com base nesses ensaios, concluiu-se que *T. cruzi* I predomina no ciclo silvestre e *T. cruzi* II no ciclo doméstico, promovendo a doença de Chagas em humanos (Breniere et al., 1998; Fernandes et al., 1998; Zingales et al., 1998).

A evolução dos dois grupos de *T. cruzi* foi investigada a partir da análise de sequências do SSU rDNA (Briones et al., 1999). Árvores filogenéticas sugeriam que os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II divergiram entre 88 e 37 milhões de anos atrás. Por outro lado, outros autores, tendo como base a sequência de dois genes específicos de tripanossomas, que codificam a dihidrofolato redutase-timidilato sintetase (DHFR-TS) e tripanotiona redutase (TR), estimaram a divergência dos dois grupos entre 16 a 3 milhões de anos atrás (Machado, Ayala, 2001).

1.2.1 Classificação atual dos grupos de *T. cruzi*

Nos dez anos que sucederam o consenso do Comitê de Expertos, a comunidade científica continuou explorando a diversidade dos isolados de *T. cruzi*, utilizando diferentes marcadores moleculares. O laboratório de Michel Tibayrenc propôs que o grupo *T. cruzi* II estaria dividido em cinco sub-grupos, denominados IIa-IIe (Brisse et al., 2000). Alguns desses grupos corresponderiam a organismos híbridos.

Em 2009, em Búzios (Rio de Janeiro), a comunidade científica sentiu a necessidade de padronizar novamente a nomenclatura dos grupos de *T. cruzi*, visando facilitar a comunicação entre os pesquisadores e elucidar aspectos eco-epidemiológicos e de patogenicidade dos grupos. O Comitê recomendou que o taxon do *T. cruzi* fosse dividido em seis grupos (*T. cruzi* I-VI) (Zingales et al., 2009). Cada grupo corresponde a uma unidade discreta de tipagem (DTU, “discrete typing unit”), onde a DTU é definida como um conjunto de isolados identificado por marcadores moleculares comuns (Tibayrenc, 1998). Um aspecto importante da nova nomenclatura é o fato de TcII não ser mais subdividido em cinco sub-grupos (IIa-IIe), como proposto pelo laboratório do Dr. Tibayrenc (Brisse et al., 2000), e que esses sub-grupos correspondem a DTUs independentes (TcII-VI). Na Tabela 1 apresenta-se a correspondência entre as DTUs atuais e as denominações anteriores.

Tabela 1- Correspondência entre as DTUs atuais e nomenclatura anteriores.

Designação DTU	Abreviação	Equivalente a
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> ^{Ia, b} e DTU I ^c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU II ^b
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^d , Z3-A ^e , DTU IIc ^c e <i>T. cruzi</i> III ^f
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^d , Z3-B ^e e DTU IIa ^c
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2 ^d , rDNA 1/2 ^g , clone 39 ^h e DTU IIId ^c
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2 ⁱ , Zymodeme B ^j e DTU IIe ^c

a: Anônimo, 1999; b: Falla et al., 2009; c: Brisse et al., 2000; d: Miles et al., 1981; e: Mendonça et al., 2002; f: Freitas et al., 2006; g: Souto et al., 1996; h: Tibayrenc e Ayala, 1991; i: Chapman et al., 1984; j: Carneiro et al., 1990. Vários esquemas de tipagem molecular foram desenvolvidos (revisto em Zingales et al., 2012) que permitiram estabelecer a distribuição geográfica e eco-epidemiológica das DTUs (Figura 3). Extraído Zingales et al., 2009.

1.2.2 Características eco-epidemiológicas das DTUs

Foram desenvolvidos esquemas de tipagem molecular (revisto em Zingales et al., 2012) que permitiram estabelecer a distribuição geográfica e eco-epidemiológica das DTUs (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos de transmissão doméstico silvestre. Extraído Zingales et al. 2012

A DTU TcI apresenta grande diversidade genética, sendo a mais abundante e a mais dispersa geograficamente nas Américas. Está presente em uma ampla variedade de mamíferos e vetores dos ciclos doméstico e silvestre de transmissão. Foram descritos mais de 52 gêneros de mamíferos infectados naturalmente com esta DTU, com representantes de Marsupialia, Rodentia, Primata, Chiroptera, Xenartha, Carnivora e Artiodactyla, em ordem de abundância. TcI é encontrado preferencialmente, mas não exclusivamente, em *Rhodnius* spp. A infecção humana com TcI é prevalente no México e em países da América Central e norte da América do Sul. Esta DTU promove miocardiopatias chagásicas.

TcII é encontrado predominantemente no centro e sul da América do Sul, mas a sua verdadeira extensão ainda não está clara (Zingales et al., 2012). Até o momento não foram descritos sub-genótipos desta DTU, sendo TcII geneticamente

muito homogêneo. TcII é a principal linhagem encontrada em pacientes brasileiros que apresentam manifestações cardíacas (Carranza et al., 2009), digestivas e mistas.

A linhagem TcIII está associada ao ciclo de transmissão silvestre no Brasil e países vizinhos, sendo encontrada principalmente em tatus e didelfídeos de hábitos terrestres. TcIII foi descrita em cães domésticos e em casos raros de infecção humana na Amazônia (Zingales et al., 2012). Na DTU TcIII foram evidenciados dois grandes grupos associados à origem geográfica: o clado Norte (Colômbia, Venezuela e Brasil) e o clado Sul (Paraguai e Bolívia) (Llewellyn et al., 2009; Marcili et al., 2009a).

A DTU TcIV mostra um padrão de distribuição geográfica semelhante a TcIII. TcIV é o agente secundário da doença de Chagas na Venezuela (Miles et al., 1981). No Brasil, a distribuição geográfica é restrita à região Amazônica, sendo comum em macacos e triatomíneos do gênero *Rhodnius*, e encontrada ocasionalmente em humanos (Marcili et al., 2009b).

Análises baseadas nos genes *Cytb*, *SSU rRNA*, dentre outros, permitem separar os isolados TcIII das Américas do Norte e do Sul, com divergências de sequência entre 1,2% e 2,4% (Lewis et al., 2009; Marcili et al., 2009b). O grupo da América do Norte tem sido esporadicamente reportado em cachorros e guaximins e em *T. gerstaeckeri* e *T. sanguisuga* (Roellig et al., 2008).

As linhagens TcV e TcVI estão associadas com a doença de Chagas nas regiões sul e central da América do Sul, promovendo cardiopatias e megassíndromes. Essas linhagens são raramente encontradas no ciclo silvestre (Zingales et al., 2012).

1.2.3 Dois modelos principais para a origem das DTUs híbridas

Embora a estrutura populacional de *T. cruzi* seja predominantemente clonal (Tibayrenc et al., 1986; Tibayrenc e Ayala, 1988), uma série de evidências indica a ocorrência de troca genética entre parasitas, originando organismos híbridos (revisto em Sturm e Campbell, 2010).

As evidências da ocorrência de heterozigose em isolados naturais de *T. cruzi* provém de estudos de genes individuais (Bogliolo et al., 1996; Brisse et al., 1998; Carrasco et al., 1996; Chapman et al., 1984; Souto et al., 1996). O padrão de

heterozigose observado em várias regiões do genoma de cepas TcV e TcVI sugeriu que essas DTUs seriam híbridas e derivadas de TcII e TcIII (Sturm et al., 2003; Sturm e Campbell, 2010). Nas demais DTUs, TcI, TcII, TcIII e TcIV, observa-se uma homozigose alélica (Sturm et al., 2003). Dois modelos foram propostos para a origem das DTUs híbridas: o modelo de “Duas Hibridizações” (Westenberger et al., 2005) e o modelo de “Três Ancestrais” (Freitas et al., 2006) (Figura 4).

Figura 4 - Modelos de (A) Duas Hibridizações e (B) Três Ancestrais para explicar a origem das DTUs híbridas. Os retângulos indicam as distintas DTUs. Fusão de duas células e trocas genéticas são indicadas por ovais, com a contribuição parental indicada pelas setas vermelhas (Extraído de Zingales et al., 2012).

No modelo de “Três Ancestrais” postula-se que as DTUs TcI, TcII e TcIII sejam ancestrais e que as trocas genéticas recentes entre TcII e TcIII teriam originado as DTUs TcV e TcVI. Nesse modelo, a origem de TcIV não foi investigada. O modelo de “Duas Hibridizações” (Westenberger et al., 2005) postula uma troca genética antiga entre TcI e TcII, com perda de heterozigose na progênie para gerar TcIII e TcIV, seguida por um evento de hibridização recente entre TcII e TcIII para produzir TcV e TcVI (revisto em Zingales et al., 2012). Portanto, de acordo com este modelo, as DTUs TcIII, IV, V e VI seriam híbridas.

1.2.4 *T. cruzi* em morcegos – Tcbat

A associação entre espécies morcegos e mais de 30 espécies do gênero *Trypanosoma* está amplamente documentada em nível mundial (Cavazzana et al.,

2010). Morcegos infectados com *T. cruzi* são encontrados em diversas regiões do Brasil, desde a floresta Amazônica como em áreas urbanas do Centro, Nordeste e Sudeste (referências em Marcili et al., 2009b). A confirmação de que os tripanossomos encontrados em morcegos sejam da espécie *T. cruzi* é obtida a partir da infecção em modelos experimentais. Além disto, a análise da sequência de genes da SSU rDNA, gGAPDH e citocromo b permite distinguir *T. cruzi* de outros tripanossomos de morcego, incluindo *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. rangeli* (Cavazzana et al., 2010; Maia da Silva et al., 2009; Marcili et al., 2009a)

Quando métodos tradicionais de tipagem de *T. cruzi*, baseados na amplificação do domínio D7 do rDNA 24S α (Souto et al., 1996) e da região intergênica do gene SL (Fernandes et al., 2001), foram aplicados a 4 isolados de morcego da Amazônia, concluiu-se pertencerem a TcI. Por outro lado, para 11 isolados de morcegos de outras regiões do Brasil verificou-se uma nova combinação de genótipos: um padrão TcII para a SL e um novo padrão para o produto de amplificação do domínio D7, que apresentou 140 pb (Marcili et al., 2009b) (Figura 5). Esse grupo de isolados ganhou o título provisório de 'Tcbat' e aguarda melhor caracterização para definir se constituiria uma nova DTU – TcVII (Zingales et al., 2012). Mais recentemente isolados de Tcbat foram encontrados em morcegos no Panamá (Pinto et al., 2012). As análises filogenéticas baseadas na sequência dos genes gGAPDH e citocromo b colocam Tcbat como um clado distinto, mas próximo a TcI (Cavazzana et al., 2010).

Figura 5 - Produtos da amplificação do domínio D7 do rDNA 24S α (Souto et al., 1996) e da região intergênica do gene SL (Fernandes et al., 2001) de cepas TcI, TcII e Tcbat. (Modificado de Marcili et al., 2009a).

1.3 Quimioterapia para a doença de Chagas

Tendo em vista que na América Latina cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* e que não há perspectivas a curto prazo para uma vacina esterilizante (Camargo, 2009), a quimioterapia ainda é de fundamental importância. Há quarenta anos utilizam-se dois fármacos nitro-heterocíclicos para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox (NFX, Lampit® - (Bayer AG., Leverkusen, Alemanha) (4-(5-nitrofurfurilideno)-amino-1,1-dióxido-3-metiltiomorfolina)), e benznidazol (BZ, Rochagan® (Hoffmann-La Roche AG., Basileia, Suíça); LAFEPE., Recife, Brasil) (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química do Nifurtimox (A) e Benznidazol (B).

NFX e BZ são pró-fármacos que necessitam ser ativados por uma nitroredutase (NTR) mitocondrial do tipo I do parasita para exercer os efeitos tripanocidas (Meija et al., 2012; Wilkinson et al., 2008). NFX age via geração de radicais nitroânion que, na presença de oxigênio, formam intermediários reativos (O_2 e H_2O_2). O regime de tratamento recomendado com NFX é de 8-10 mg/kg/dia, dividido em 2-3 doses diárias, por 60 a 120 dias (Coura, 2009).

O mecanismo de ação de BZ é pouco conhecido, mas seu provável efeito tripanocida envolve a ligação covalente de intermediários do composto com DNA, RNA, lipídios e proteínas do parasito (Goijman et al., 1985; Polak e Richle, 1978). O melhor regime de tratamento com BZ é de 5 mg/kg/dia, dividido em 2-3 doses diárias, durante 60 dias (Coura, 2009).

Ambos os fármacos têm efeitos colaterais. Para NFX, os efeitos colaterais mais comuns incluem sintomas do sistema nervoso central, tais como insônia, desorientação, irritabilidade, polineuropatia, parestesias, dor de cabeça, mialgia,

artralgia, tontura, alterações do humor e neurites periféricas. Esses efeitos determinam que cerca de 50% dos pacientes não completem o tratamento (Coura, 2009). Os efeitos secundários do BZ ocorrem em 20% a 30% dos pacientes e consistem de dermatites alérgicas e nódulos polimórficos que costumam aparecer de 8 a 10 dias após o início do tratamento (Rassi et al., 2012).

1.3.1 A eficácia do tratamento e suscetibilidade de cepas de *T. cruzi* aos quimioterápicos

Estudos clínicos indicam que NFX e BZ apresentam elevada eficácia no tratamento da fase aguda da doença de Chagas com o alcance de até 80% de cura parasitológica (Cançado et al., 2002). Além disto, BZ promove 60-70% de cura parasitológica em crianças com até 14 anos de idade no Brasil e na Argentina (Andrade et al., 1996; Sosa Estani et al., 1998). No entanto, outros estudos em pacientes da mesma faixa etária mostraram taxas de cura inferiores (Silveira et al., 2000; Solari et al., 2001; Urbina 2009; Yun et al., 2009). Em adultos na fase crônica, apenas 5-20% dos pacientes foram considerados parasitologicamente curados (Cançado, 2001; Dias, 2006). Por outro lado, dados preliminares sugerem que o tratamento com BZ na fase crônica pode ocasionar um melhor prognóstico da evolução clínica das cardiomiopatias chagásicas (Sosa-Estani et al., 2009; Viotti et al., 2006). Para uma definição mais abrangente do efeito benéfico do tratamento com BZ na cardiomiopatia chagásica crônica, foi lançado o projeto internacional, multicêntrico, BENEFIT - *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* – que visa investigar se o tratamento etiológico: (i) reduz significativamente a carga parasitária dos pacientes (avaliada por técnicas de PCR) e (ii) reduz a mortalidade e o desenvolvimento de complicações cardiovasculares (Marin-Neto et al., 2009). O recrutamento de pacientes foi iniciado em novembro de 2004 e inclui 42 centros da Argentina, Bolívia, Brasil e Colômbia. Espera-se ter os resultados no final de 2014.

A eficácia de BZ e NFX varia de acordo com a área geográfica onde são administrados. De fato, em pacientes de países do norte da América do Sul e da América Central tratados com BZ, o declínio do nível de anticorpos anti-*T. cruzi* ocorre mais precocemente em relação a pacientes de países do Cone Sul (Yun et al., 2009). Tais diferenças foram atribuídas a diferenças na suscetibilidade aos

fármacos entre as cepas do parasita que circulam em diferentes regiões (resistência natural) (Yun et al., 2009).

As razões das diferenças marcantes na eficácia dos dois fármacos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas não são conhecidas. Elas foram atribuídas a diferenças fenótípicas entre as cepas, variações nas propriedades farmacocinéticas das drogas (meia-vida curta) e à sua limitada capacidade de penetração nos tecidos onde os parasitas se concentram na fase crônica (Buckner, 2008; Urbina e Docampo, 2003).

Em trabalho seminal, Filardi e Brener (1987) investigaram o efeito do tratamento com BZ e NFX em camundongos inoculados com 47 cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes, vetores domésticos e vetores silvestres. Os autores verificaram que a eficácia terapêutica variava de 0% a 100%, e classificaram as cepas em resistentes (0 a 33% de cura); intermediárias (33 a 66% de cura) e sensíveis (66 a 100% de cura) às drogas. Curiosamente, a maior parte das cepas apresentava suscetibilidade ou resistência a ambas as drogas (Filardi e Brener, 1987).

1.3.2 Novos fármacos para a doença de Chagas

Tendo em vista as falhas terapêuticas dos únicos dois fármacos disponíveis para a doença de Chagas, a busca de novos compostos, de administração oral, que tenham uma duração de tratamento mais curta, com menos efeitos colaterais e que sejam ativos contra todas as cepas do parasita é de elevada prioridade em pesquisa (Technical Report Series- TRS-WHO 2012). O Comitê de expertos que redigiu a TRS também recomenda combinações de drogas existentes e de novas drogas, para evitar o surgimento de resistência. Nesse âmbito, BZ e NFX são os candidatos naturais para serem utilizados em combinação com novos fármacos.

Os avanços significativos no conhecimento biológico, bioquímico e o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* contribuíram para a identificação de alvos biológicos para a proposta de novos fármacos (Dias et al., 2009). Atualmente algumas classes de compostos químicos mostram uma atividade promissora contra *T. cruzi in vitro* e em modelos experimentais. Esse é o caso dos inibidores da biossíntese do ergosterol - posaconazol e ravuconazol (Urbina 2009), que estão sendo avaliados em ensaios clínicos de fase II (<http://www.dndi.org/diseases->

projects/portfolio.html). Lamentavelmente, num primeiro ensaio clínico realizado na Espanha, o posaconazol não mostrou nenhuma eficácia (dados não publicados). Inibidores da protease cruzipaina (vinil sulfona K777), que participa do processo de invasão celular e escape do parasita do sistema imune (Dias et al., 2009), também mostram efeito parasiticida em estudos pré-clínicos. Outros alvos promissores foram identificados na via da síntese de tripanotona; via de salvação de purinas; transferência de ácido siálico e nas DNA topoisomerasas I e II (Dias et al., 2009; TRS-WHO, 2012; Urbina, 2010).

Nitroimidazóis são uma classe de compostos muito utilizados no tratamento de agentes patogênicos, dentre os quais os tripanossomas. Esse é o caso do 5-nitroimidazol (fexinidazol - FX) em desenvolvimento clínico para o tratamento da doença do sono (tripanossomíase africana humana) (Torreele et al., 2010). A ação de FX contra *T. cruzi* foi investigada em camundongos infectados com cepas com diferentes graus de suscetibilidade a BZ, resultando na cura parasitológica de ~80% dos animais infectados com cepas resistentes a BZ (Bahia et al., 2012). FX também se mostra promissor no tratamento da leishmaniose visceral (Wyllie et al., 2012).

1.4 Os transportadores ABC

Um dos mecanismos de resistência a drogas, conservado desde bactérias até o homem, consiste no bombeamento de compostos para fora da célula, diminuindo, desta forma, sua concentração interna e, conseqüentemente, sua citotoxicidade (Balzi e Goffeau, 1994; Lewis, 1994; Oullette et al., 1998). Nesse processo atuam transportadores ABC, que são proteínas transmembranares de uma superfamília específica que apresenta sítios de ligação a ATP, sendo, por este motivo, denominadas transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (Higgins, 2007). Transportadores ABC são altamente conservados entre as espécies, o que indica que a maior parte desses transportadores existe desde o início da evolução (Dean, 2002).

Transportadores ABC atuam em distintos processos, sendo classificados como importadores, exportadores e proteínas não-transporte. Importadores e exportadores são responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de substâncias, enquanto as proteínas não-transporte estariam envolvidas em

processos celulares, tais como, o reparo do DNA, a tradução ou a regulação da expressão gênica (Liu et al., 2011).

Em humanos, as funções conhecidas de transportadores ABC incluem transporte de colesterol e lipídios, multirresistência a drogas, apresentação de antígenos e homeostase de ferro mitocondrial (Liu et al., 2011).

A unidade funcional mínima de todos os transportadores ABC consiste de quatro domínios. Dois domínios citoplasmáticos que ligam e hidrolisam o ATP - NBDs (*nucleotide binding domains*), e dois domínios transmembrana, TMDs (*transmembrane domains*), compostos por α -hélices múltiplas (geralmente seis), que constituem a estrutura pela qual os compostos atravessam a membrana. Os quatro domínios estão unidos em um único polipeptídeo nas proteínas ABC completas (Figura 7A). Os NBDs contêm em sua sequência os motivos Walker A e Walker B (Walker et al., 1982) que são comuns a todas as proteínas que ligam ATP. O motivo Walker A, também conhecido como “P-loop” (“loop” de ligação ao fosfato) possui o padrão GXXXXGK(T/S), onde X indica qualquer aminoácido. O motivo Walker B é (R/K)XXXXGXXXXLhhhhD, onde X representa qualquer aminoácido e h, um aminoácido hidrofóbico. Os domínios NBD ainda possuem uma pequena sequência conservada chamada assinatura ABC, ou motivo LSGGQ, que é típica dos membros da superfamília ABC (revisto em Higgins, 2007).

Figura 7 - Transportador ABC (*ATP binding cassette*). Esquemas: (A) Estrutura geral de um transportador ABC. (B) Funcionamento do transportador ABC e hidrólise do ATP. Extraído. http://physics.syr.edu/~lmovilea/Research_Profile.html.

Dados estruturais, em conjunto com a caracterização genética e bioquímica desses transportadores, permitiram propor um modelo de transporte do tipo “ATP-interruptor” (Higgins, e Linton, 2004). A força motriz para o transporte de determinado composto é a mudança conformacional do dímero NBD (Figura 7B). A ligação de ATP promove a rotação dos domínios NBDs e a formação de um dímero fechado que engloba duas moléculas de ATP. A hidrólise do ATP e liberação de ADP e Pi determinam a abertura do dímero. Esta cinética pode diferir entre os transportadores, dependendo da extensão da cooperatividade entre os dois NBDs e os sinais provenientes dos TMDs. A ligação de ATP pelos NBDs e a formação do dímero fechado induzem mudanças conformacionais substanciais nos TMDs (Rosenberg et al., 2001), que determinam a translocação do composto e a reorientação do sítio de ligação, que passa a ser exposto à face extracelular da membrana, momento em que o composto pode ser liberado (revisto em Higgins, 2007).

A superfamília de transportadores ABC está dividida em oito subfamílias (ABCA-ABCH), das quais sete (ABCA-ABCG) são encontradas no genoma humano (Sauvage et al., 2009). As subfamílias se diferenciam quanto à homologia, número e arranjo dos NBDs e TMDs, localização celular e função. Membros das subfamílias B, C e G estão intimamente relacionados com o transporte de drogas, bombeando o composto para fora da célula, contra um gradiente de concentração, num processo dependente de energia (revisto em Higgins, 2007). Este é um dos mecanismos de resistência a drogas mais bem conhecido, conservado desde bactérias até o homem (Lage, 2003).

Os transportadores ABC das subfamílias A, B e C são transportadores completos (*full-size transporters*), possuindo dois TMDs e dois NBDs fundidos em um único polipeptídeo, e são representados pela topologia (TMD-NBD)₂. Os transportadores das subfamílias G e E são meio-transportadores sendo constituídos por um único NBD acoplado a um único TMD localizado na porção N-terminal ou C-terminal da proteína, sendo representados pela topologia (TMD-NBD) ou (NBD-TMD) (Figura 8) (Sauvage et al., 2009).

Figura 8 – Representação esquemática da estrutura de transportadores ABC. Proteínas das subfamílias ABCA, ABCB e ACBC contêm dois TMDs e dois NBDs fundidos em um único polipeptídeo, representado pela topologia (TMD-NBD)₂. Meio-transportadores das subfamílias ABCD e ABCG possuem um único TMD unido a um único NBD, localizado na porção N-terminal ou C-terminal da proteína, sendo representados, respectivamente, por (TMD-NBD) e (NBD-TMD). (Modificado de Sauvage et al., 2009).

Membros das subfamílias ABCE e ABCF não são considerados transportadores ABC. Esses membros são citoplasmáticos, possuem um sítio de ligação a ATP em sua estrutura e correspondem a inibidores de ribonucleases e fatores de iniciação da transcrição. A subfamília ABCH, representada por três membros, foi incluída na subfamília ABCA (Igarashi et al., 2004).

Genes que codificam proteínas ABC foram descritos em vários parasitas protozoários (revisto em Lage, 2003; Sauvage et al., 2009) e seu papel na quimiorresistência foi estabelecido em alguns casos, como, por exemplo, em *Leishmania* spp (Coelho et al., 2003, 2004, 2006, 2007; Leprohon et al., 2006; Oullette e Borst, 1991), *Entamoeba histolytica* (Descoteaux et al., 1995), *Cryptosporidium parvum* (Benitez et al., 2007; Bonafonte et al., 2004; Perkins et al., 1997), *Plasmodium falciparum* (Alker et al., 2007; Nair et al., 2007; Price et al., 1999; Sidhu et al., 2006) e *T. brucei* (Alibu et al., 2006; Maser e Kaminsky, 1998; Shahi et al., 2002).

Leprohon e colaboradores (Leprohon et al., 2006) analisaram dados dos genomas de *Leishmania major* e *L. infantum* e descreveram a família completa de transportadores ABC de *Leishmania* e o padrão de expressão gênica nos estágios de desenvolvimento e em cepas resistentes a drogas. Utilizando lâminas de microarranjos de DNA, esses autores verificaram a expressão dos genes ABCA3 e ABCG3 no estágio amastigota e a superexpressão dos genes ABCF3, ABCA3,

ABCC3 e ABCH1 no estágio promastigota em duas cepas antimônio-resistentes quando comparadas com o parental sensível (Leprohon et al., 2006). Um transportador ABC, denominado PRP1 (pentamidine resistance protein 1) de *L. major*, foi correlacionado com resistência a pentamidina (Coelho et al., 2003, 2007, 2008).

Em *T. brucei*, a super-expressão do transportador *TbABCC2* aumenta cerca de 10 vezes a resistência a melarsoprol *in vitro*, mas não teve nenhum efeito sobre a sensibilidade a suramina ou diamidinas (revisto em Sauvage et al., 2009). Isolados de *T. brucei gambiense* de pacientes do Sudão, Uganda e Angola resistentes a drogas apresentaram uma mutação no gene *TbAT1* (Matovu et al., 2001).

Dentre os vários genes de transportadores ABC presentes no genoma de *T. cruzi* (El Sayed et al., 2005), apenas três genes ABC foram estudados em maior profundidade (Dallagiovanna et al., 1994; 1996; Lara et al., 2007; Torres et al., 2004). No entanto, para nenhum deles foi verificada uma associação com o fenótipo de resistência a BZ (Murta et al., 2008). O transportador *TcABCA1* é codificado por um gene de cópia única e diferencialmente expresso durante o ciclo de vida, não sendo expresso na forma tripomastigota (Torres et al., 2004). *TcABC1* está localizado na membrana plasmática, bolsa flagelar e vesículas intracelulares, podendo estar implicado no tráfego intracelular e envolvido em vias de endocitose e exocitose (Torres et al., 2004).

Em sua dissertação de mestrado, Rafael Aquino de Araújo Gomes identificou no genoma de CL Brener 58 genes codificadores de transportadores ABC hipotéticos, distribuídos nos 41 cromossomos de CL Brener (Wethearly et al., 2009). O gene *TcABCG1*, foco desta dissertação, localiza-se no cromossomo 37 (Araújo, 2012).

1.5 Transportadores ABC da subfamília G (ABCG)

1.5.1 Transportadores ABCG humanos

A subfamília G de transportadores ABC consiste de meio-transportadores que necessitam dimerizar para formar um transportador ativo. Os membros da subfamília ABCG melhor caracterizados são de humanos e várias revisões foram compiladas a respeito (Cserepes et al., 2004; Koshiba et al., 2008; Kusuha e Sugiyama, 2007;

Velamakanni et al., 2007). A família ABCG de humanos contém 5 membros (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 e ABCG8), que apresentam a topologia geral mostrada na Figura 9A. Sua estrutura é caracterizada por um NBD N-terminal e um TMD C-terminal, constituído por seis hélices que atravessam a membrana.

Figura 9 - Transportadores ABC da subfamília G. Painel (A). Topologia: NBD está localizado na porção N-terminal da proteína e TMD próximo à extremidade C-terminal. As seis hélices transmembrana são representadas por cilindros. No NBD, encontram-se os motivos Walker A, Walker B e assinatura ABC. (Adaptado de Cserepes et al., 2004). Painel (B). Esquema do homodímero de ABCG2 humano. Notar as pontes S-S inter e intramoleculares (Adaptado de Koshiba et al., 2007).

Os membros da subfamília ABCG de humanos estão associados ao transporte de esteróis e outros lipídios. Por outro lado, ABCG2 (também denominado *breast cancer resistance protein* - BCRP) foi caracterizado como sendo um transportador que confere resistência a múltiplas drogas e que atuaria no efluxo de diversos xenobióticos (ver a seguir).

ABCG1 humano foi descrito em 1996. É um transportador de 678 aminoácidos (75,6 kDa) associado com o retículo endoplasmático, vesículas do aparelho de Golgi e membrana plasmática. ABCG1 atua no transporte de colesterol e efluxo de esfingomielina e fosfatidilcolina. ABCG1 pode formar heterodímeros com ABCG4 (descrito em 2001).

ABCG2 é um transportador de 655 aminoácidos, de natureza glicoproteica (72 kDa). Ao contrário dos demais transportadores da subfamília G, ABCG2 forma homodímeros (Figura 9B). Nessa estrutura, as pontes S-S da Cisteína Cys603 ligam os dois monômeros ABCG2. A Cys592 e a Cys608 formam pontes S-S intramoleculares, importantes para a estabilidade do transportador. A porção de açúcar encontra-se N-ligada à Asparagina Asn596. ABCG2 foi descoberto em células de câncer de mama resistentes a doxorubicina (Doyle et al., 1998). Subsequentemente, a superexpressão de ABCG2 foi observada em muitas outras células tumorais resistentes a drogas. A expressão de ABCG2 confere resistência a: (i) íons tóxicos, tais como Hoechst 33342; (ii) agentes anti-tumorais como mitoxantrona, daunomicina e doxorubicina; (iii) topotecan e SN-38; e (iv) vários antibióticos (macrolídios, tetraciclina e fluoroquinolonas). Mais recentemente, foi mostrado que ABCG2 promove a excreção biliar de fluoroquinolonas e estaria envolvido na secreção tubular de ciprofloxacina e grepafloxacina. Polimorfismos genéticos em ABCG2 foram implicados nas diferenças interindividuais das propriedades farmacocinéticas de várias drogas. Nesse sentido, o resíduo na posição 482, presente na porção citoplasmática do TMD3, seria importante para o transporte do substrato e hidrólise do ATP, mas não seria crítico para o reconhecimento e ligação do substrato (Ejendal et al. 2006; Pozza et al. 2006). O conjunto de informações indica que o transportador ABCG2 humano atuaria na disponibilidade e atividade farmacológica de uma vasta gama de compostos (Hardwick et al., 2007; Leslie et al., 2005). Esse transportador é encontrado na membrana apical de células com função excretora e nos capilares cerebrais.

Os transportadores ABCG5 e ABCG8 humanos unem-se para formar complexos heterodiméricos (Graf et al., 2003) e são expressos em níveis elevados na membrana canalicular de hepatócitos, onde atuam no efluxo do colesterol na bile.

1.5.2 Transportadores ABCG de tripanossomatídeos patogênicos

Sauvage et al. (2009) realizaram uma busca detalhada de sequências ABC no genoma de tripanossomatídeos. No que tange a subfamília ABCG, foram identificados 6 membros em *Leishmania* spp., 4 membros em *T. brucei* e 4 membros em *T. cruzi*. Este número deve estar subestimado, tendo em vista que Rafael Gomes

Aquino de Araújo, em sua dissertação de mestrado, identificou 7 transportadores ABCG putativos no genoma de CL Brener.

Em *L. infantum* um transportador ABCG-símile (*LiABCG6*), localizado principalmente na membrana plasmática do parasita, tem como substratos putativos fosfolipídios, alquilfosfolipídios e aminoquinolinas e participaria de seu transporte ativo do citoplasma para o meio externo. Parasitas com superexpressão de *LiABCG6* mostraram-se resistentes a miltefosina, perifosina e edelfosina (Castanys-Muñoz et al., 2008). O mesmo transportador, em *L. donovani*, participaria da resistência a camptotecina, promovendo seu efluxo (BoseDasgupta et al., 2008). Ainda em *L. infantum* o transportador *LiABCG4* atuaria na resistência a sitamaquina (Castanys-Muñoz et al., 2007).

1.5.3 O transportador *TcABCG1* de *T. cruzi*

Em seu projeto de doutoramento Margoth Moreno Vigo comparou a expressão diferencial de genes entre dois isolados de *T. cruzi*: um suscetível a BZ e outro naturalmente resistente à droga, utilizando lâminas de microarranjos de DNA, contendo oligonucleotídios representantes de cerca 12.300 genes codificadores de proteína de CL Brener (Moreno, 2008). Dentre a série de genes diferencialmente expressos, dois genes que codificam transportadores ABC putativos foram superexpressos na cepa resistente (GenBank XM_813521.1 e XM_814141.1). A análise da estrutura da proteína codificada por esses genes permitiu concluir que XM_813521.1 codifica um transportador ABC da subfamília G, que foi denominado *TcABCG1*, e XM_814141.1, um transportador da subfamília D, denominado *TcABCD1*, por serem os primeiros transportadores dessas famílias a serem descritos em *T. cruzi*. Transportadores da subfamília D não foram relacionados com o transporte de drogas. Em humanos, esses transportadores estariam localizados na membrana do peroxissomo e, provavelmente, participariam no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da organela (Tanaka et al., 2002). Desta forma, nosso grupo concentrou os estudos no transportador *TcABCG1*, tendo em vista dados anteriores que sugeriam a participação de transportadores ABCG na resistência a drogas em humanos e *Leishmania* spp. (ver item acima).

Ensaio de RT-PCR em tempo real confirmaram os dados dos microarranjos para *TcABCG1* e mostraram maior abundância relativa de transcritos desse gene em

5 isolados resistentes a BZ, quando comparado a 3 isolados sensíveis (Figura 10) (Moreno, 2008).

Figura 10 - Abundância relativa de transcritos do gene *TcABCG1* em cepas sensíveis (barras brancas) e resistentes (barras hachuradas) a BZ. (Moreno, 2008).

A busca pelo programa blastp no banco de dados não reduntante (*nr*) de sequências proteicas do NCBI, utilizando como entrada (*query*) a sequência proteica completa de *TcABCG1* (GenBank XP_818614.1) (665 aminoácidos), mostrou elevada similaridade com transportadores da subfamília G de espécies de *Leishmania* e de de tripanossomas africanos (Tabela 2).

Rafael Araujo, em sua dissertação de Mestrado investigou o efeito da transfecção em CL Brener (cepa sensível a BZ) do gene *TcABCG1* de cepas resistentes a BZ, clonados no vetor pROCK (DaRocha et al., 2004). Os resultados mostraram um aumento da resistência a BZ (de cerca 30%) nas culturas transfectadas com o gene de cepas resistentes à droga, acompanhado de um incremento de aproximadamente 2 vezes na abundância relativa dos transcritos do gene *TcABCG1* (Araújo, 2012).

O conjunto de dados acima indica que: (i) existem diferenças regionais no sucesso do tratamento da doença de Chagas com o fármaco BZ; (ii) há variação de suscetibilidade ao fármaco entre as cepas de *T. cruzi* que circulam nas distintas regiões; (iii) dados de nosso laboratório sugerem o envolvimento do transportador *TcABCG1* no processo da resistência a BZ e (iv) transportadores ABC da subfamília G estão sendo implicados na resistência a drogas em vários organismos. Desta forma, é importante caracterizar o gene *TcABCG1* em cepas sensíveis e resistentes

a BZ para verificar se existem polimorfismos que justificariam as diferenças de fenótipo, além da abundância dos transcritos.

Tabela 2 - Lista das quinze primeiras sequências com maior similaridade com a sequência proteica completa de *TcABCG1* de *T. cruzi* obtida por blastp contra o banco de dados *nr* de sequências proteicas do NCBI, ranqueadas pela máxima identidade do alinhamento (busca em 21/06/2013).

GenBank	Descrição	E-value	Max score	Max score
XP_818614.1	ABC transporter [<i>T. cruzi</i> strain CL Brener]	0.0	1382	100
XP_806666.1	ABC transporter [<i>T. cruzi</i> strain CL Brener]	0.0	1217	98
EKF29704.1	ABC transporter putative [<i>T. cruzi marinkellei</i>]	0.0	1176	94
XP_001680778.1	putative ATP-binding cassette proteinsubfamily G, member 2 [<i>L. major</i> strain Friedlin]	0.0	767	60
XP_001463092.1	ATP-binding cassette protein subfamily G, member 2 [<i>L. infantum</i> JPCM5]	0.0	769	60
XP_001680777.1	putative ATP-binding cassette protein subfamily G, member 1 [<i>L. major</i> strain Friedlin]	0.0	763	60
XP_001463091.1	ATP-binding cassette protein subfamily G, member 1 [<i>L. infantum</i> JPCM5]	0.0	761	60
XP_003872021.1	putative ATP-binding cassette protein subfamily G, member 2 [<i>L. mexicana</i>]	0.0	762	59
XP_003872020.1	putative ATP-binding cassette protein subfamily G, member 1 [<i>L. mexicana</i>]	0.0	743	59
XP_001561938.2	putative ABC transporter [<i>L. braziliensis</i>]	0.0	736	59
XP_001561945.1	putative ABC transporter [<i>L. braziliensis</i>]	0.0	736	59
CBH15853.1	ABC transporter, putative [<i>T. b. gambiense</i> DAL972]	0.0	725	58
XP_823004.1	ABC transporter [<i>Trypanosoma b. brucei</i> strain 927/4]	0.0	724	58
CCC93886.1	putative ABC transporter [<i>T. congolense</i> IL3000]	0.0	707	57
CCC51708.1	putative ABC transporter [<i>T. vivax</i> Y486]	0.0	700	57

2 OBJETIVOS

O objetivo central do projeto é caracterizar o gene do transportador *TcABCG1* em várias cepas de *T. cruzi*,

Os objetivos específicos são:

1. Determinar a sequência do gene *TcABCG1* de cepas sensíveis e resistentes a BZ, pertencentes a distintas DTUs;
2. Realizar análises genealógicas de *TcABCG1* em cepas de *T. cruzi* pertencentes a distintas DTUs;
3. Verificar eventos de recombinação intragênica no gene *TcABCG1* de cepas consideradas híbridas;
4. Verificar a presença de variações de aminoácidos no gene *TcABCG1*, potencialmente associadas ao fenótipo de resistência;
5. Caracterizar a localização subcelular do transportador *TcABCG1*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios e Soluções

- Meio LB – BactoTryptona 1%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 1%, pH 7,0;
- Meio LB/ágar – Meio LB contendo ágar 1,5%, pH 7,0;
- Meio LIT – NaCl 2%; KCl 0,2%; Na₂HPO₄ anidro 4%; Triptose 2,5%; Infusão de Fígado 0,5%; Glicose 0,4%; Penicilina 0,02%; Estreptomicina 0,02%; Hemina 0,0025%; Soro Fetal Bovino 10%, pH 7,4;
- Meio SOC – Glicose 20 mM; Bacto Tryptona 2%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 0,0585%; KCl 0,0186%, pH 7,0;
- PBS – Tampão Fosfato de Sódio 10 mM; NaCl 150 mM, pH 7,4;
- TBS 1X –Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 150 mM NaCl;
- SDS – Lauril Sulfato de Sódio;
- TBE 1x – Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0;
- TAE 1X –Tris-base, 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0;
- TE – Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0;
- TBS – NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM, pH 7,5;
- Benznidazol – solução estoque 50 mM em DMSO.

3.2 Cepas de *T. cruzi*

As características das cepas e clones utilizados neste estudo quanto à sua classificação em DTUs, hospedeiro/vetor de onde foram isolados e origem geográfica estão descritas na Tabela 3. Para algumas cepas, a suscetibilidade a BZ foi determinada. As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion-Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio foi preparado segundo Castellani et al. (1967). As culturas foram mantidas a 28 °C sem agitação e repicadas na fase exponencial de crescimento.

Tabela 3 - Características de cepas e clones quanto à sua classificação em DTUs, hospedeiro/vetor de onde foram isolados e origem geográfica.

Cepa/clone	DTU ^a	Hospedeiro/vetor	Origem	Suscetibilidade a BZ Cl ₅₀ (μM) ^b	% de cura ^c	Fenótipo (para BZ)
Silvio X 10 cl1	Tcl	<i>Homo sapiens</i>	PA, Brasil	26,1 ± 2,5	ND	Resistente
Colombiana	Tcl	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia	58,6 ± 5,7	7	Resistente
YuYu	Tcl	<i>Triatoma infestans</i>	MG, Brasil	40,5 ± 1,8	0	Resistente
VL 10	Tcll	<i>Homo sapiens</i>	MG, Brasil	30,4 ± 6,9	27	Resistente
Berenice 62	Tcll	<i>Homo sapiens</i>	MG, Brasil	14,6 ± 3,6	93	Sensível
M6241 cl6	Tclll	<i>Homo sapiens</i>	PA, Brasil	ND	ND	ND
893	Tclll	<i>Euphractus sexcintus</i>	RGN, Brasil	74,9 ± 7,6	ND	Resistente
4166	TclV	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM, Brasil	ND	ND	ND
NR cl3	TcV	<i>Homo sapiens</i>	Chile	ND	ND	ND
SO3 cl5	TcV	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	10,6 ± 0,7	ND	Sensível
CL Brener	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>	RGS, Brasil	13,2 ± 0,8	100	Sensível
793	Tcbat	<i>Myotis levis</i>	SP, Brasil	16,6 ± 2,2	ND	Sensível
294	Tcbat	<i>Myotis levis</i>	SP, Brasil	ND	ND	ND
597	Tcbat	<i>Myotis nigricans</i>	SP, Brasil	ND	ND	ND

a: Classificação segundo Zingales et al. (2009).

b: Suscetibilidade a BZ determinada segundo Moreno et al. (2010). Média e desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas, contendo cada uma três réplicas técnicas. Ver Resultados.

c: Porcentagem de cura determinada em modelo experimental (Filardi e Brener, 1987).

ND = não determinado.

3.3 Determinação da suscetibilidade a BZ

Formas epimastigotas na fase exponencial de crescimento foram distribuídas em placas de 24 poços numa densidade de 10^7 células/mL e expostas a diferentes concentrações de BZ (0 a 160 μM) por 72 horas a 28 °C. Ao término deste período, a densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada em relação ao controle na ausência do composto. Os ensaios foram realizados em triplicata na mesma placa e repetidos em dias diferentes (réplicas biológicas). Para o cálculo da Cl₅₀, que corresponde à concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50%, os dados foram analisados com os programas Sigma plot (versão 11) empregando o algoritmo *Four Parametric Logistic*. O cálculo de média e de desvio-padrão da Cl₅₀ foi obtido com o programa Microsoft Office Excel (versão 2010).

3.4 Clonagem e sequenciamento do gene *TcABCG1*

3.4.1 Extração do DNA

A um sedimento de 3×10^9 formas epimastigotas foram adicionados 10 mL de PBS e 500 μ L do reagente Qiagen Proteinase K (QIAamp Blood Maxi kit, Qiagen®, Venlo, Holanda). A extração foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA, eluídas em água, foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.4.2 Amplificação do gene *TcABCG1*

O gene foi amplificado a partir do DNA genômico (100 ng) das cepas, utilizando o par de iniciadores *TcABCG1*kbF (5'-TCTAGAATGTCTTGCTGCCGAGC-3', sítio de restrição para a enzima *Xba*I sublinhado) e *TcABCG1*kbR (5'-CTCGAGCTAAACTTTGTACCGCGCG-3', sítio de restrição para a enzima *Xho*I sublinhado) e a enzima *Pfu* DNA polimerase (Fermentas). Os iniciadores foram desenhados sobre as regiões que delimitam o gene *TcABCG1* da cepa CL Brener (GenBank XM_813521.1). O DNA foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 5 minutos. A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 30 ciclos de três temperaturas: 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1,5 minutos para anelamento dos iniciadores a 58 °C e 4 minutos de extensão a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.4.3 Purificação do produto de PCR

Os produtos da amplificação de *TcABCG1* das cepas foram purificados a partir do gel de agarose utilizando-se os kits *Pure Link™ PCR Purification Kit* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) ou *HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit* (Real Biotech, EUA). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm.

3.4.4 Adição de nucleotídios de adenina ao produto de PCR

O produto da PCR obtido com a enzima *Pfu* DNA polimerase apresenta pontas cegas. Para sua ligação ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega®, Fitchburg, Wisconsin, EUA) é necessária a adição do nucleotídeo de adenina às extremidades 3'. Para esta finalidade, foi utilizado o kit pGEM-T *Easy Vector System* (Promega®). Nesta reação o produto da PCR foi incubado na concentração final de 50 ng/μL.

3.4.5 Ligação ao vetor de clonagem

A ligação do gene *TcABCG1* ao vetor pGEM-T *Easy* foi realizada conforme as instruções do kit pGEM-T *Easy Vector System* (Promega®). As reações foram feitas em volume final de 10 μL, contendo até 4 μL de volume de inserto (respeitando-se a proporção molar inserto:vetor de 6:1), 5 μL de Tampão *Rapid Ligation 2x* e 1 μL da enzima T4 DNA ligase (Promega®). As reações foram incubadas por 16 horas, a 4 °C.

3.4.6 Transformação em bactérias competentes DH5α

Alíquotas com 100 μL de bactérias *E. coli* (cepa DH5α) competentes foram descongeladas do freezer a -80 °C e a cada uma acrescentou-se 6 μL da reação de ligação, seguindo-se de incubação por 20 min no gelo. Após este período, os tubos foram incubados a 42 °C por exatamente 50 segundos e recolocados no gelo por mais 2 min. A cada tubo acrescentou-se 250 μL de meio SOC e os mesmos foram incubados a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 90 min. O volume total da suspensão bacteriana foi então semeado em placas de LB/ágar contendo 100 μg/mL de ampicilina, 50 μL de X-gal 20 mg/mL (USB) e 100 μL de IPTG 100 mM (Gibco®).

As colônias contendo os plasmídios recombinantes apresentaram coloração branca, uma vez que o gene clonado interrompe o gene β-galactosidade e desta forma, as bactérias transformadas não tem a capacidade de degradar a X-gal.

3.4.7 PCR de colônia

As colônias bacterianas brancas foram inoculadas em 4 mL de meio LB/amp e incubadas a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante de 180 rpm. A presença do inserto nos plasmídeos foi analisada por PCR de colônia. Uma pequena alíquota de cultura bacteriana (1 µL) foi incubada em um meio reacional (volume final de 15 µL) contendo 0,375 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1,5 µL do tampão 10x fornecido pelo fabricante, 4 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs e 4 mM dos iniciadores, desenhados sobre as regiões que flanqueiam uma região de 616 pb, TcABCG616F (5'– ACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTG–3') e TcABCG616R (5'– CGGTAAAGACCCACCATCCAGTATA–3') (Tabela 4). O DNA plasmidial foi desnaturado numa temperatura maior do que a amplificação comum para promover o rompimento da parede bacteriana (incubação a 95 °C durante 10 min). A amplificação foi realizada nas mesmas condições descritas acima para a amplificação do gene *TcABCG1*. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.4.8 Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial dos clones recombinantes confirmados pela PCR de colônia foi realizada a partir de 4 ou 250 mL da cultura bacteriana, conforme instruções dos kits *Pureyield Plasmid Miniprep System* ou *Pureyield Plasmid Midiprep System* (Promega®). O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

3.5 Sequenciamento do gene *TcABCG1*

O sequenciamento do gene *TcABCG1* foi realizado em sequenciador ABI-PRISM® 3100 (IQ-USP). Para o sequenciamento das duas fitas do gene, clonado em pGEMT-*Easy*, foram utilizados iniciadores específicos do plasmídio – M13PUCF e M13PUCR – e pares de iniciadores desenhados para esse gene, e que amplificam

fragmentos de 616 e 492 pb (Tabela 4). A posição dos iniciadores no gene *TcABCG1* é mostrada na Figura 11.

Tabela 4 - Características das cepas utilizadas no sequenciamento do gene *TcABCG1*

Iniciador	Sequência (5' para 3')	Localização	Sentido
M13PUCF	GTA AAACGACGGCCAG	pGEMT- <i>Easy</i>	senso
M13PUCR	GTCATAGCTGTTTCCTG	pGEMT- <i>Easy</i>	anti-senso
616F	ACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTG	911–935 nt ^a	senso
616R	CGGTAAAGACCCACCATCCAGTATA	1502–1526 nt ^a	anti-senso
492F	GCTTTTCGCTGCGCGTGAGG	509–528 nt ^a	senso
492R	CCTTGGAAATTTCTGGATCTTGGAGCA	974–1000 nt ^a	anti-senso

a: Posição no gene *TcABCG1*

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCCTCATCATTTGGAGTCTGACGACCAA
ATCGCGCCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTCCATCAAG
GGCTCCGTCGCGCAGTTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATTCCCCTCTCA
TGGCATAATTTGTCATATTTCGGCAAACGGCAGCAAAAATTTCTTTCGCGCCTCACAGGAACAGCGTTACCATCACGA
TGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCTGACCGACTTACAACC
TCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGCGTCATTACCGCAGGATGGTT
GGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTCCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTG
AGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTTGGAGGAATTACGCCTTGTCCTACTGC
CGCGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGTCTCTGGTCTTTCGCGGTGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGT
GTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAATTTCTGTTGCTGGATGAACCCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTG
AAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCGACGGTGATTTACACCATTACCCAGCCCACTGCT
GAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACCGGGGGTCGATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAAA
TCCGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGTCTGAACGATATACGCCAAGCGATTCTTTTATGAAGTTG
CTCCAAGATCCAGAAAATTTCCAAGGTACTGGTTAAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCCA
CATACAACCGCGTTGAGCTAAATCCCAATCCCTCCGAGTCTCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTGGT
AGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAATTCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCAT
GTATACATTTTTTACATTTTATACAGGCTGCCTTCTTTCGAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAA
GATGATTTAGCTGGTATGCAGGATCGCGAGGGAGTTTTTTTCATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACT
TTTATCATGGTCAACTCCTTTATGCAAGATAAGGCCCTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCT
TTTATTTTTCTTTTTATCAAAAACCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTTGCCTTTCTTGAGTGCTGTATT
TTTATACTGGATGGTGGGTCTTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACT
GAAGTGGCCTCGGGTCTTGGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCT
GTGATTTTGCTACCGCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGG
TTGGAGAAGCCATCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATT
CGGTGTGATGGTAGAGGCAAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAA
CTTGGGTTTTACAGCAGAAGCAATATGAAAACCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGC
GGTTGGGCCG

Figura 11 – Localização dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do gene *TcABCG1*. Sequência de *TcABCG1* do haplótipo não Esmeraldo de CL Brener (Genbank XM_813521.1). As cores dos iniciadores são as mesmas utilizadas na Tabela 4.

Foram sequenciados no mínimo seis clones de cada cepa. O DNA plasmidial de cada clone (100 ng) foi incubado em um meio reacional (volume final de 10 µL) contendo 1 µL da solução de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA), 2 µL do tampão 5x fornecido pelo fabricante e 3,2 µM

dos iniciadores. O DNA foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 3 minutos. A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 35 ciclos de três temperaturas: 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos para anelamento dos iniciadores e 4 minutos de extensão a 60 °C. As reações de sequenciamento foram realizadas por método convencional, recomendado pelo fabricante, no laboratório CAGT (IQ-USP).

3.5.1 Análise e alinhamento das sequências

Os eletroferogramas das sequências foram analisados com o software Phred-Phrap-Consed (Phred scores acima de 80) (Gordon et al., 1998). As sequências (*reads*) foram utilizadas para montar sequências gênicas completas (*contigs*). As sequências foram alinhadas pelo programa Clustal X 2.0.12 (Higgins et al., 1992) e os alinhamentos editados com o uso do Bioedit (Biological Sequence Alignment Editor for Windows) (Hall, 1999). A presença de SNPs foi identificada visualmente. O alinhamento de aminoácidos foi obtido com o programa ClustalX 2 e editado com o editor Bioedit.

3.6 Reconstrução de genealogias

Para a reconstrução de árvores filogenéticas utilizou-se o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 2002). As reconstruções foram realizadas pelo método de distânciamento (*neighbour-joining*) (Saitou, Nei, 1987), o método de máxima parcimônia (Fitch, 1971), com os algoritmos de busca Branch&Bound e busca heurística, e o método de máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981). Para determinar o modelo de substituição mais adequado para o conjunto de dados realizou-se o teste de razão de verossimilhança (*LRT, Likelihood Ratio Test*) com o programa Modeltest (versão 3.7; Posada e Crandall, 1998). O grau de sustentação dos ramos das árvores (consistência interna dos dados) foi avaliado pela análise de Bootstrap, com o programa PAUP*, com 1000 pseudo-réplicas para cada método.

Para a visualização das árvores foi utilizado o programa TreeView (versão 1.6.6) (Page, 1996). A genealogia em rede (*network genealogy*) foi inferida pelo método *Neighbor-Net* no software Splitstree 4.10 (Huson e Bryant, 2006). A

estimativa do suporte de *Internode* foi realizada pela análise de Bootstrap com 1000 pseudo-réplicas.

3.7 Análise da recombinação intragênica

A presença de recombinação intragênica foi analisada pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3 (*Recombination Detection Program*). Este método foi desenvolvido para identificar sequências nucleotídicas parentais dentro de sequências suspeitas de recombinação (Salminen et al., 1995).

Os parâmetros do programa são: window size=200, step size=20, utilizando árvores geradas por *neighbour joining*, bootstrap com cut off de 70%, aproximando-se o valor de “p” por uma binomial e modelo de substituição de Jin e Nei (1990). A confiabilidade do programa foi aferida utilizando-se 1000 pseudo réplicas de bootstrap.

3.8 Clonagem e expressão do gene *TcABCG1* no vetor pQE-30 Xa

3.8.1 Clonagem de uma região do gene *TcABCG1*

Uma região de ~730 pb do gene *TcABCG1* da cepa CL Brener, compreendida entre as posições nt 232 a nt 960, foi amplificada por PCR. A região foi amplificada a partir do DNA genômico (100 ng) da cepa CL Brener, utilizando o par de iniciadores *Tc.PQE2.F* (5'-GCATGCAATTTGTCATATTCGGCA-3', sítio de restrição para a enzima *SphI* sublinhado) e *Tc.PQE2.R* (5'- CGATATACGCCAAGCGATAAAGCTT-3', sítio de restrição para a enzima *HindIII* sublinhado), em presença da enzima *Pfu* DNA polimerase. O DNA foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 5 minutos.

A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 30 ciclos de três temperaturas: 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1,5 minutos para anelamento dos iniciadores a 58 °C e 4 minutos de extensão a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O produto da amplificação foi purificado com o PCR Purification Kit (Invitrogen®) e clonado no vetor pQE-30Xa (Quiagen®) (Figura 12). Ambos foram digeridos com as enzimas de restrição *SphI* e *HindIII*. Após ligação, os plasmídios foram introduzidos

em bactérias competentes *E.coli* XL1 Blue MRF. Os plasmídios recombinantes foram confirmados por sequenciamento.

Figura 12 - Mapa do vetor pQE-30 Xa. Extraído do manual da Qiagen®.

3.8.2 Expressão da proteína clonada no vetor pQE-30 Xa

As bactérias *E.coli* XL1 Blue MRF com plasmídio recombinante foram cultivadas a 37 °C em meio LB com ampicilina (100µg/mL) e tetraciclina (25 µg/mL) até a cultura atingir uma DO de 0,5-0,6. A expressão da proteína recombinante foi induzida por adição de 1 mM IPTG. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo. Após a centrifugação, as amostras foram suspensas em 100 µL em tampão de amostra para SDS- PAGE 2X (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2,3%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, mercaptoetanol 20 mM), aquecidas a 100 °C por 5 min e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, contendo SDS (SDS- PAGE) (Laemmli, 1970). O padrão de migração foi analisado após coloração com Coomassie Brilliant Blue.

3.8.3 Purificação da proteína recombinante

As bactérias foram lisadas por tratamento com lisozima, em tampão de lise (conforme indicações da fabricante da coluna de níquel, Qiagen®) e submetidas a

vibração sônica em *Ultrasonic Processor VCX130 130 Watt* (Sonics®) na potência 80%, a 4 °C, em ciclos de 2 segundos, com intervalos de 2 segundos entre os ciclos, por 10 minutos. As amostras foram submetidas a centrifugação a 13.000 x g e o perfil protéico do precipitado e sobrenadante foi analisado em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE).

3.8.4 Purificação dos corpos de inclusão

O precipitado da sonicação foi ressuspendido em 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo Triton 2%. A suspensão foi sonicada por 10 segundos, com uma amplitude de 40%, evitando formação de espuma. Em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 NaCl 1 mM e novamente centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4° C. O precipitado foi ressuspenso em Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. A proteína foi dosada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica como padrão.

3.9 Obtenção de anticorpos

Os anticorpos policlonais foram obtidos contra (a) a proteína recombinante de uma região de *TcABCG1* e (b) formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1. Os anticorpos foram obtidos em camundongos Balb/c machos. Para cada antígeno, cinco animais de 45 dias foram imunizados por via subcutânea. A primeira imunização foi realizada com 38 µg da proteína recombinante e 75 µg de proteína total de formas epimastigotas rompidas por sonicação. Os antígenos foram emulsificados em adjuvante de Freund completo (1:1), num volume total de 200 µL.

Nos inóculos subsequentes, os antígenos foram emulsificados em adjuvante de Freund incompleto (1:1), no mesmo volume final. As imunizações foram feitas com intervalos de 15 dias. Após 3 imunizações, os animais foram anestesiados, uma alíquota de sangue foi coletada via plexo ocular para a titulação do anticorpo por imunofluorescência indireta. Foi constatado um bom título na quarta inoculação e, após 15 dias, o sangue foi coletado e os animais foram sacrificados sob anestesia e relaxante muscular. Para a obtenção do soro, o sangue foi incubado a 37°C por 30

minutos, mantido a 4° C por 30 minutos e centrifugado a 1.000 x g por 15 minutos. O soro foi armazenado a -20 °C.

3.10 Imunofluorescência indireta

Para o preparo das lâminas foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1. Os parasitas foram centrifugados 7.000 rpm por 10 minutos, para remover o meio LIT, e lavados duas vezes com PBS-BSA 1%. Os parasitas foram fixados com para-formaldeído 5% à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, lavados 3 vezes com PBS. Os parasitas foram colocados nos poços das lâminas de imunofluorescência, deixando secar à temperatura ambiente durante a noite. As células foram incubadas com diferentes diluições do anticorpo primário, em câmara úmida a 37 °C por 1 hora. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem. Adicionou-se o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, obtido em coelho, conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC) (Sigma) na diluição de 1:200. As células foram lavadas novamente 3 vezes com PBS. Após lavagem, os núcleos dos parasitas foram marcados com 20 µg/mL de DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen®). As lamínulas foram montadas com glicerol 10%.

As imagens foram adquiridas em microscópio de imunofluorescência (Nikon®, modelo Eclipse E600 - IQ-USP) e/ou por microscopia confocal (modelo Leica TCS SP5 IIAOBS - UNIFESP). As imagens foram obtidas com o programa Tandem Scanner Spinning Disk Confocal Imaging System e editadas no programa ImageJ.

3.11 Western blot

As formas epimastigotas da cepa Sílvia X 10 cl1 foram lavadas com PBS, ressuspensas em tampão de amostra de eletroforese contendo 1 mg/mL PMSF e 1 mg/ml TLCK, aquecidas a 100 °C por 5 min, e submetidas a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8%. A proteína recombinante de ~26 kDa, derivada de uma região de *TcABCG1*, foi submetida a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, (Amersham Biosciences., Amersham, Reino Unido)) no tampão: Tris-HCl 20 mM, pH8,3; glicina 192 mM; metanol 20%

(v/v), com voltagem de 50 volts por 16 horas a 4 °C. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (0,2% p/v Ponceau S; 1,0% v/v ácido acético), para marcar as posições dos marcadores de tamanho molecular. As membranas foram lavadas com TBS pH 7,5, até a retirada do corante, cortadas em tiras, lavadas três vezes em TBS pH 7,5 por 10 minutos e foram bloqueadas com TBS-Tween 0,05%-leite desnatado (Molico, Nestlé S.A. São Paulo., Brasil) 5% por 2 horas. Em seguida foram incubadas com o anticorpo primário, numa diluição 1:100 e 1:200 no tampão TBS-Tween 0,05%-leite desnatado 1%, a 4°C, por 16 horas, sob agitação, lavadas novamente por três vezes com TBS. O anticorpo secundário (Goat anti-mouse, conjugado a AlexaFluor® 680 #A- 21058, (Life Technologies™, Carlsbad, California., EUA) numa diluição de 1:15000 em TBS-T, foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas três vezes em TBS. A imagem foi obtida por meio do escaneamento no equipamento Odyssey®.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da suscetibilidade a BZ

A suscetibilidade a BZ foi avaliada em formas epimastigotas de 9 cepas (Tabela 3). Entre as cepas observa-se que o valor de CI_{50} (concentração de BZ que inibe o crescimento em 50%) variou de 10 a 75 μM (Tabela 3). O critério de atribuir a determinada cepa o fenótipo de suscetibilidade ou resistência a BZ baseou-se em dados publicados por Filardi e Brener (1987), num estudo onde camundongos foram infectados com distintas cepas e tratados com BZ ou NF. De acordo com a porcentagem de cura, as cepas infectantes foram classificadas em resistentes (taxas de cura < 33%), parcialmente suscetíveis (taxas de cura de 33% a 66%) ou suscetíveis (taxas de cura >66%). Dentre as cepas cuja suscetibilidade a BZ determinamos, cinco haviam sido utilizadas nos experimentos de Filardi e Brener (1987) e classificadas (Tabela 5). Para cada cepa foi observado um paralelismo entre o valor da CI_{50} para BZ e a porcentagem de cura. Em face a esta observação, decidimos arbitrariamente estabelecer um valor de corte de CI_{50} para BZ = 25 μM para separar cepas resistentes de cepas sensíveis. Assim como descrito anteriormente (Moreno et al., 2010), não há dados suficientes para concluir se determinada DTU está associada à resistência ou à sensibilidade a BZ.

Tabela 5 - Sensibilidade a BZ de cepas de *T. cruzi*: valores e porcentagens de cura.

Cepa/clone	DTU	CI_{50} (μM BZ)	% de cura ^a	Fenótipo
Colombiana	TcI	58,6 $\pm$ 5,7	7	Resistente
YuYu	TcI	40,5 $\pm$ 1,8	0	Resistente
VL 10	TcII	30,4 $\pm$ 6,9	27	Resistente
Berenice 62	TcII	14,6 $\pm$ 3,6	93	Sensível
CL Brener	TcVI	13,2 $\pm$ 0,8	100	Sensível

^a Porcentagem de cura determinada em modelo experimental (Filardi e Brener, 1987).

4.2 A estrutura putativa do transportador *TcABCG1*

O clone CL Brener (DTU TcVI) é um organismo híbrido cujos parentais mais próximos pertencem às DTUs TcII e TcIII (El Sayed et al., 2005; Sturm et al., 2003; Zingales et al., 2012). A sequência do genoma deste organismo foi publicada em 2005 e mostrou a presença de dois haplótipos (El Sayed et al., 2005). A média de divergência de sequência entre os haplótipos codificadores de proteína é de 2,2% (El Sayed et al., 2005).

Tendo em vista que um dos haplótipos apresentava uma elevada similaridade com a sequência do genoma da cepa Esmeraldo (DTU TcII), as sequências de CL Brener foram anotadas como “*non-Esmeraldo-like haplotype*” ou “*Esmeraldo-like haplotype*”. Neste trabalho os haplótipos são abreviados como NEsmo e Esmo. O gene *TcABCG1* é um gene de cópia única. Na Tabela 6 são apresentados os números de acesso do GenBank das sequências nucleotídicas e proteicas dos dois haplótipos de CL Brener.

Tabela 6 - Números de acesso do Genbank das sequências nucleotídicas e proteicas dos haplótipos de *TcABCG1*

Haplótipo	Sequência nucleotídica	Sequência proteica
NEsmo	XM_813521.1	XP_818614
Esmo	XM_801573.1	XP_80666.1

Nos ensaios de microarranjos de DNA, realizados por Margoth Moreno Vigo (ver Introdução), o haplótipo de *TcABCG1* que mostrou hibridização diferencial entre cepas sensíveis e resistentes a BZ foi o haplótipo NEsmo, cuja sequência proteica é mostrada na Figura 13. Nesta indica-se a localização dos domínios Walker A e B, assinatura ABC e regiões transmembrânicas das seis alfa hélices. Na Tabela 7 especifica-se a posição das regiões. Salienta-se que na lâmina de microarranjo não estava representada a sequência do haplótipo Esmo do transportador.

MSCCRAEVNEPVTTPSSASSLESDDQIAPKQKGNEPQIEDYSIIAPGFSIKGSVAQFDVEQNKSSVSGRFSIPVS
 WHNLSYSANGTKILCGLTGTALPSRCLAVM**GSSGAGKT**TFLNAISDRLTTSRTLKLTGKRQLGDLEYKRHYRMV
 GFVAQDDILSPRATPEDSLRFSLRVRRGTSISETNKFVEETLEELRLVHCRETIVGIPGLVSG**LSGGER**KRTSIG
 VELICDPK**ILLLDE**PTSGLDVTSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAETLTTFDDLMLLTGGRCAYHGTMAK
 SVEYFESIGFPCPERYTPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLKHGVRTPHTTAVELNPNPSESPTAKNIESYLG
 RFGSTSCIQFQELFRRFSMDLSRNHVYIF**FSHFIQAAFFAVIVGLIFLNVKDD**LAGMQDREGVFFMVTMNRAMGQT
 FIMVNSFMQDKALYVREQMVGSYSPFIFFLSKTLVEF**PMRVFFAFLECCILYWMVGLYRQAGAFFYYFAVIALLT**
EVASGLGFAIGATFKSLV**VASGTAPVILLPLAMVGGLLANT**DRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHIDHI
 RCDGRGKPPGFCKDKPQNGEDILRQLGFQKQYENWVLWLT**LALLYIAFRGWAVISLYSA**ARTKF

Walker A **Assinatura ABC** **Walker B** **Regiões transmembrânicas**

Figura 13 - Localização dos domínios Walker A e B, assinatura ABC e regiões transmembrânicas das seis alfa hélices na sequência protéica do haplótipo NEsmo de *TcABCG1*

Tabela 7 - Posições de elementos/domínios na sequência protéica do haplótipo NEsmo de *TcABCG1*.

Elemento	Posição	Sequência
----------	---------	-----------

Domínio de ligação ATP

Walker A	106 a 113	GSSGAGKT
Assinatura ABC	214 a 223	LSGGER
Walker B	234 a 239	ILLLDE

Regiões transmembrânicas das 6 alfa hélices

1 ^a	404 – 426	FSHFIQAAFFAVIVGLIFLNVKD
2 ^a	463 - 485	LYVREQMVGSYSPFIFFLSKTLV
3 ^a	487 – 508	FPMRVFFAFLECCILYWMVGLY
4 ^a	514 – 536	FFYYFAVIALLTEVASGLGFAIG
5 ^a	544 – 566	VASGTAPVILLPLAMVGGLLANT
6 ^a	637 - 659	VLWLT LALLYIAFRGWAVISLYS

A estrutura putativa do transportador *TcABCG1* foi determinada pelo sistema SOSUI da Universidade de Nagoya (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) e é mostrada na Figura 14. *TcABCG1* é um semi-transportador ABC que apresenta um domínio de ligação a ATP (NBD) e um domínio transmembrana (TMD), constituído por 6 segmentos em α -hélice.

O NBD contém sequências conservadas: os motivos Walker A e Walker B, comuns a todas as proteínas que ligam ATP, e a assinatura ABC (Higgins et al., 1988).

Figura 14 - Estrutura putativa do transportador *TcABCG1* de *T. cruzi*. Indica-se a posição dos domínios Walker A (azul), assinatura ABC (amarelo) e Walker B (roxo).

4.3 Comparação da sequência primária da proteína codificada pelos haplótipos NEsmo e Esmo de *TcABCG1*

O alinhamento dos haplótipos NEsmo e Esmo de *TcABCG1* é mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Alinhamento de aminoácidos dos haplótipos NEsmo (XP_818614) e Esmo (XP_806666.1) de *TcABCG1* de CL Brener.

No alinhamento são observadas 12 mutações não sinônimas de resíduos de aminoácidos, das quais 3 mantêm as características da polaridade da cadeia lateral. Não há mutações localizadas nos motivos Walker A e B, assinatura ABC ou na região transmembrânica das 6 hélices. Apenas uma mutação não sinônima está

localizada no sítio de ligação ao ATP (posição de 109 a 271) na região do NBD. Nesse caso, há substituição de T (treonina) por K (lisina).

4.4 Clonagem e sequenciamento do gene *TcABCG1*

O gene *TcABCG1* de 14 cepas foi clonado (conforme descrito em Materiais e Métodos). Após clonagem, seis clones de cada cepa foram integralmente sequenciados. Os cromatogramas obtidos do sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer foram usados para a montagem de *contigs* com sequências de alta qualidade (Phred acima de 40, que corresponde a menos de um erro para cada 10000 bases de sequenciadas). Para as cepas das DTUs TcV e TcVI (consideradas híbridas) foram verificados dois haplótipos. Para as cepas TcV, os haplótipos foram denominados A e B. Para a cepa TcVI (CL Brener) os haplótipos são denominados Esmo e NEsmo. As sequências obtidas, em formato fasta, são apresentadas no Anexo 1.

4.5 Genealogia de *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*

Tendo em vista a elevada conservação de sequências nucleotídicas nas cepas pertencentes à mesma DTU, como será mostrado a seguir (ver Fig. 24), a história evolutiva provável do gene *TcABCG1* de *T. cruzi* foi inferida a partir de análises genealógicas. A partir do alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de 14 cepas (incluindo os haplótipos de TcV e TcVI) foram geradas árvores pelos métodos de *neighbour-joining* (Figura 16) e máxima verossimilhança (Figura 17).

Figura 16 - Árvore gerada pelo método de *neighbour-joining* com a sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de 14 cepas de *T. cruzi*. Os números nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) (1000 pseudo-réplicas). A barra indica o número de substituições por sítio.

Figura 17 - Árvore gerada pelo método máxima verossimilhança com a sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*. Os números nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) (1000 pseudo-réplicas). Modelo evolutivo para a árvore por máxima verossimilhança: K81uf+l = 3611.61883. As DTUs referentes aos ramos são indicadas

Cenários evolutivos complexos que envolvem eventos de hibridização, recombinação e transferência horizontal gênica, (como é o caso de algumas DTUs de *T. cruzi*), não são adequadamente representados por árvores dicotômicas. Nestes casos, redes filogenéticas (*phylogenetic networks*) devem ser utilizadas (Huson e Bryant, 2006) (Figura 18).

Figura 18 - Genealogia em rede da sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*. A genealogia em rede foi inferida usando *Neighbor-Net* pelo método *Splitstree* 4.10. O suporte de *Internode* foi estimado pela análise de *bootstrap* com 1000 pseudo-réplicas.

Nas genealogias são observados os agrupamentos referentes a TcI, TcII, TcIII e Tcbat. Os haplótipos Esmo e NEsmo de CL Brener (TcVI) são agrupados respectivamente, com os clados TcII e TcIII. Os haplótipos A das cepas TcV (NR e SO3) também são agrupados próximos a TcII, ao passo que os haplótipos B estão mais próximos ao clado de TcIII. As sequências de Tcbat estão mais próximas de TcI. Nossas observações coincidem com as conclusões anteriores, baseadas em análises filogenéticas com a utilização de diferentes marcadores moleculares, que definem o clado Tcbat como um grupo independente, com elevada proximidade a TcI (Marcili et al., 2009; Cavazzana et al., 2010;).

A genealogia em rede apresenta várias anastomoses entre os clados, indicando diferentes trajetórias prováveis de conexão dos grupos. Esta característica é típica da ocorrência de taxas elevadas de trocas genéticas (hibridização e/ou recombinação).

4.6 Eventos de recombinação intragênica no gene *TcABCG1* de cepas consideradas híbridas

A presença de cepas híbridas no taxon *T. cruzi* é bem conhecida (revisito em Zingales et al., 2012). Conforme apresentado na Introdução, dois modelos foram propostos para explicar a origem destas cepas: o modelo de “Duas Hibridizações” (Westenberger et al., 2005) e o modelo de “Três Ancestrais” (Freitas et al., 2006). De acordo com o primeiro modelo, seriam DTUs híbridas TcIII, TcIV, TcV e TcVI, sendo as DTUs TcIII e TcIV resultado de uma hibridização antiga entre TcI e TcII, e as DTUs TcV e TcVI, resultado de hibridizações recentes entre TcII e TcIII. No modelo de “Três Ancestrais” postula-se que as cepas TcI, TcII e TcIII sejam ancestrais e que as trocas genéticas recentes entre TcII e TcIII tenham originado TcV e TcVI.

Tendo em vista a natureza híbrida controversa de TcIII e TcIV, analisamos inicialmente a possível presença de recombinação intragênica na cepa M6241 (TcIII) e cepa 4166 (TcIV) utilizando as cepas parentais Sílvia (TcI) e Berenice62 (TcII) (Figura 19 A e B).

Figura 19 - Análise de recombinação intragênica no gene *TcABCG1* das cepas: (A) M6241 (TcIII) e (B) 4166 (TcIV) pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (Sílvia linha vermelha) e TcII (Berenice62 linha verde).

Nos haplótipos das duas cepas foram observadas algumas regiões próximas a TcI e outras próximas a TcII. Na cepa TcIV as regiões mais próximas a TcII são mais abundantes que na cepa TcIII e apresentam altos valores de *bootstrap* (Figura 19B). Estes dados parecem contrariar a hipótese de que TcIII seria um grupo ancestral.

Em seguida analisamos eventos de recombinação intragênica no haplótipo A da cepa SO3 cl5 (DTU TcV), usando como cepas parentais os pares de cepas TcI (Sílvia) e TcII (Berenice62) (Figura 20A) e TcII (Berenice62) e TcIII (M6241) (Figura 20B).

Figura 20 - Análise de recombinação intragênica no haplótipo A da cepa SO3 cl5 pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (Sílvia, linha vermelha), TcII (Berenice62, linha verde) e TcIII (M6241, linha azul).

Usando os dois pares de parentais, nota-se que o haplótipo A é inteiramente derivado de TcII.

Analisamos a recombinação intragênica no haplótipo B da cepa SO3 cl5 (DTU TcV), usando os mesmos pares de cepas parentais (Figura 21 A e B).

Figura 21 - Análise de recombinação intragênica no haplótipo B da cepa SO3 cl5 pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (Sílvia, linha vermelha), TcII (Berenice62, linha verde) e TcIII (M6241, linha azul).

Para o haplótipo B, notam-se regiões próximas a TcI e TcII com valores de *bootstrap* médio (Figura 21). As regiões próximas a TcI são menos abundantes, mas presentes, sugerindo um evento de recombinação antigo. Quando se usam as cepas parentais TcII e TcIII, no início da sequência nota-se um longo trecho próximo a TcII. O meio da sequência é próximo a TcIII, com altos valores de *bootstrap*. Esta

observação coincide com os dados da análise genealógica (Figura 16, 17 e 18) que indicam a localização do haplótipo B próximo a TcIII. Notam-se ainda dois pontos claros de recombinação entre as sequências de TcII e TcIII.

Passamos a analisar a recombinação intragênica nos haplótipos Esmo e NEsmo de CL Brener (Figura 22) usando como parentais os dois pares de cepas usadas para a DTU TcV. Os dados indicam que o haplótipo Esmo (Figura 22A e B) é inteiramente TcII, como observado para o haplótipo A de TcV, confirmando as análises de genealogia. Por sua vez o haplótipo NEsmo é inteiramente TcIII.

Utilizando-se como parentais TcI e TcII (Figura 22C) notam-se pequenas regiões próximas a TcI e TcII com elevado *bootstrap* no início do gene e regiões com menor *bootstrap* no meio do gene. O baixo valor de *bootstrap* nestas regiões provavelmente deriva do longo tempo de divergência após o evento de hibridização.

A comparação do padrão de recombinação intragênica no haplótipo B da cepa SO3 cl5 e no haplótipo NEsmo de CL Brener sugere uma evolução independente das cepas TcV e TcVI após o evento de troca genética.

Figura 22 - Análise de recombinação intragênica nos haplótipos Esmo e NEsmo de CL Brener pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (Sílvia, linha vermelha), TcII (Berenice62, linha verde) e TcIII (M6241, linha azul).

Analizamos ainda possíveis eventos de recombinação no gene da cepa Tcbat 294 (Figura 23), utilizando três pares de parentais putativos: TcI (Sílvia)-TcII (Berenice62); TcII e TcIII (M6241) e TcI-TcIII. Os dados sugerem que Tcbat pode ter sido originado de evento(s) de recombinação entre TcI e TcIII.

Figura 23 - Análise de recombinação intragênica no gene *TcABCG1* de Tcbat pelo método de Bootscan manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (Sílvia, linha vermelha), TcII (Berenice62, linha verde) e TcIII (M6241, linha azul).

4.7 A busca de polimorfismos de nucleotídeo único potencialmente associados ao fenótipo de resistência a BZ

A partir das sequências obtidas do gene *TcABCG1* de todas as cepas, realizamos um alinhamento múltiplo visando identificar possíveis polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) associados ao fenótipo de resistência a BZ (Figura 24). A inspeção da figura não permite evidenciar nenhum SNP associado ao fenótipo de resistência a BZ.

Passamos a analisar se variações de aminoácidos teriam alguma associação com a suscetibilidade ou resistência a BZ. O alinhamento de aminoácidos do transportador *TcABCG1* de todas as cepas foi obtido com o programa ClustalX 2.0 for Windows e editado por BioEdit (Figura 25). A sequência de Sílvia X10 cl1 foi usada como referência. As variações de aminoácidos não sinônimas são indicadas na Figura.

Chama a atenção a total conservação de sequência de aminoácidos de *TcABCG1* intra DTU: nas 3 cepas TcI; 2 cepas TcII; e 2 cepas Tcbat.

Nas cepas de TcI a TcVI observa-se a total conservação da sequência na região compreendida entre as posições 146 e 340. Esta região pertence ao domínio

NBD iniciado no resíduo 1 até o resíduo 400. Nas cepas Tcbat há uma única variação de aminoácido nessa região.

Tomando como referência as cepas TcI (todas resistentes a BZ), encontramos 6 variações não sinônimas conservadas nas 2 cepas TcII, independentemente se a cepa é sensível ou resistente a BZ.

A variação não sinônima de posição 50 (resíduo R nas cepas TcI) corresponde ao resíduo K nas cepas TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e Tcbat. A variação não sinônima de posição 48 (resíduo F nas cepas TcI e Tcbat), corresponde ao resíduo S conservado nas cepas TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI.

As duas cepas TcIII apresentam diversas variações não sinônimas diferentes das demais cepas.

A comparação da sequência proteica da cepa TcIII – 893 (resistente a BZ) com as cepas TcI, também resistentes à droga, não mostra nenhuma característica especial associada ao fenótipo.

O conjunto de dados será discutido adiante.

Figura 24 - Variação da sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*. A posição do nucleotídeo corresponde àquela da sequência de SilvioX10 cl1, tomada como referência. Os pontos representam nucleotídeo idêntico ao da cepa de referência. Legenda: S, suscetível; R, resistente a BZ; ND, não determinado.

Sequence logos for the TcI_Sil binding site. The top part shows the full sequence from position 1 to 340. The bottom part shows a zoomed-in view of positions 180 to 340. The logos are color-coded by amino acid: L (green), S (blue), K (red), E (purple), P (brown), V (orange), I (yellow), Q (cyan), D (light blue), A (dark blue), G (dark green), N (light green), P (brown), Q (cyan), T (pink), E (purple), Y (orange), S (blue), I (yellow), A (dark blue), G (dark green), F (light green), R (red), G (dark green), S (blue), V (orange), A (dark blue), Q (cyan), F (light green), D (light blue), A (dark blue), V (orange), E (purple), Q (cyan), N (light green), K (red), S (blue), S (blue), V (orange), G (dark green), R (red), F (light green), S (blue), I (yellow), P (brown), V (orange), S (blue), W (light blue), H (light green), N (light green), L (green), A (dark blue), Y (orange), S (blue), A (dark blue), N (light green), G (dark green), T (pink), K (red), I (yellow), L (green), C (light blue), G (dark green), L (green), T (pink), G (dark green), L (green), T (pink), G (dark green), T (pink), A (dark blue), L (green), P (brown), S (blue), R (red), C (light blue), L (green), A (dark blue), V (orange), M (light blue), G (dark green), S (blue), S (blue), G (dark green), A (dark blue), C (light blue), K (red), T (pink), T (pink), F (light green), L (green), N (light green), A (dark blue), I (yellow), S (blue), D (light blue), R (red), L (green), T (pink), T (pink), S (blue), R (red), T (pink), L (green), K (red), I (yellow), T (pink), G (dark green), K (red), R (red), Q (cyan), L (green), G (dark green), D (light blue), L (green), E (purple), Y (orange), K (red), R (red), H (light green), Y (orange), R (red), R (red), M (light blue), V (orange), G (dark green), F (light green), V (orange), A (dark blue), Q (cyan), D (light blue), I (yellow), L (green), S (blue), P (brown), R (red), A (dark blue), T (pink), P (brown), E (purple), D (light blue), S (blue), L (green), R (red).

Figura 25 - Alinhamento de aminoácidos do transportador *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*. Cepas em vermelho: resistentes a BZ; Cepas em azul: sensíveis a BZ; Cepas em preto: suscetibilidade a BZ não determinada.

4.8 Caracterização da localização celular do transportador *TcABCG1*

4.8.1 Obtenção de proteína recombinante

Para a obtenção de um antisoro que permitisse determinar a localização celular do transportador *TcABCG1* foi escolhida uma região de ~730 pb, localizada entre os nucleotídios 232 e 960, que continha os motivos Walker A e B e a assinatura ABC. A clonagem e expressão desta região permitiria a obtenção de uma proteína de ~26 kDa.

Inicialmente a região de interesse foi clonada no vetor pMAL-c4X (New England Biolabs). Foram obtidos vários clones recombinantes, cuja fidelidade foi confirmada por sequenciamento. A proteína recombinante foi adequadamente induzida a 37 °C, de acordo com as instruções do fabricante (Figura 26A). No entanto, após sonicação do lisado bacteriano, a proteína apareceu expressa na forma de corpos de inclusão (Figura 26A). Na tentativa de expressar a proteína em temperaturas mais baixas, a mesma foi para o precipitado pós-sonicação (dados não mostrados).

Em seguida foi realizada a clonagem da porção do gene *TcABCG1* no vetor pET-28a-c(+) (Novagen®). Para isto foram desenhados novos iniciadores para a amplificação do segmento. Novamente foram obtidos clones recombinantes, que, em várias condições testadas, expressaram a proteína na forma de corpos de inclusão (Figura 26B).

Uma nova tentativa de clonagem foi realizada no vetor pQE-30Xa (Quiagen®) (ver detalhes em Material e Métodos). Vários recombinantes foram obtidos. O padrão de proteínas totais de uma cultura da bactéria recombinante antes e após indução é mostrado na Figura 27. Mais uma vez, verificamos que a proteína recombinante se encontra exclusivamente no precipitado da sonicação (Figura 27). Tendo em vista que corpos de inclusão tem sido utilizados para obtenção de bons soros policlonais (ver exemplo Yang et al., 2011), o precipitado da sonicação foi parcialmente purificado (ver detalhes em Material e Métodos) e utilizado na imunização de camundongo.

Figura 26 - Expressão da proteína recombinante de uma região do gene *TcABCG1*, clonada em dois vetores de expressão. (A) pMAL-c4X e (B) pET-28 a-c(+). Mostra-se o mapa do vetor utilizado e o padrão da eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas das frações bacterianas dos clones recombinantes. A seta indica a posição da proteína recombinante.

Figura 27 - Expressão da proteína recombinante de uma região do gene *TcABCG1* clonada no vetor de expressão pQE-30Xa (Quiagen®). Apresenta-se o padrão da eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas das frações bacterianas. A seta indica a posição da proteína recombinante.

4.8.2 Obtenção de antissoros

Soros policlonais contra formas epimastigotas e contra a proteína recombinante derivada de uma região do gene *TcABCG1* foram obtidos em camundongos, conforme descrito em Materiais e Métodos.

4.8.3 Análise do reconhecimento de antígenos por Western blot

Os soros policlonais foram caracterizados por Western blot utilizando membranas contendo lisados de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1 (Figura 28A). Observa-se que o soro anti-epimastigotas reconhece vários antígenos, ao passo que o soro contra a proteína recombinante reconhece um antígeno majoritário de ~76 kDa (monômero do *TcABCG1*). Nas membranas contendo a proteína recombinante (Figura 28B), o soro contra essa proteína reage fortemente com a banda de ~26 kDa, e fracamente com duas bandas de maior massa molecular. Esses resultados atestam a especificidade do soro contra a proteína recombinante.

Figura 28 - Western blot. Reconhecimento de antígenos de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1 por soros imunes de camundongo. Painei A - Formas epimastigotas: (a) soro normal de camundongo (diluição 1:100); (b) soro anti-epimastigotas (diluição 1:100); (c) soro anti-proteína recombinante (diluição 1:100); (d) soro anti-proteína recombinante (diluição 1:200). Painei B - Proteína recombinante: (a') soro normal de camundongo (diluição 1:100); (b') soro anti-proteína recombinante (diluição 1:100).

4.8.4 Localização subcelular do transportador *TcABCG1*

Para determinar a localização subcelular do transportador *TcABCG1* nas formas epimastigotas de *T. cruzi* foi utilizado o soro anti-proteína recombinante em ensaios de imunofluorescência indireta com parasitas da cepa Sílvia X10 cl1 fixadas com para-formaldeído. As imagens foram obtidas em microscópio de imunofluorescência (Figura 29). Em paralelo, analisamos a reatividade do soro anti-formas epimastigotas e do soro normal. (Figura 30)

Figura 29 - Imunofluorescência indireta de formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro anti-proteína recombinante derivada de uma região de *TcABCG1* (diluição 1:80). Imagens em microscópio de imunofluorescência. (A) corante DAPI; (B) segundo anticorpo marcado com FITC; (C) fusão das imagens com DAPI e FITC.

O padrão de marcação com o soro anti-proteína recombinante difere do padrão obtido com o soro anti-epimastigotas. O primeiro cora fracamente o flagelo e apresenta uma reatividade difusa em todo o corpo do parasita. O segundo não cora o flagelo e dá uma forte reação na porção posterior dos epimastigotas, co-localizada com reservossomos. O soro normal, na diluição 1:80, não reage com as formas epimastigotas.

Figura 30 - Imunofluorescência indireta de formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro normal (painel superior) e soro anti-epimastigotas (painel inferior). (diluição 1:80). Imagens em microscópio de imunofluorescência. (A) corante DAPI; (B) segundo anticorpo marcado com FITC; (C) fusão das imagens com DAPI e FITC.

Para melhor visualização/identificação das estruturas reconhecidas pelo soro anti-proteína recombinante, as imagens foram obtidas por microscopia confocal (Figura 31). Observam-se sinais de imunofluorescência do transportador *TcABCG1* em todo o corpo dos epimastigotas e fraca reatividade com o flagelo. As imagens indicam reação com vesículas intracelulares. Observa-se sinal em volta do núcleo e cinetoplasto e na porção apical da rede de microtúbulos. Identifica-se dispersão do sinal na porção basal do complexo do vacúolo contrátil e bolsa flagelar. As imagens foram interpretadas pelo Dr. Renato Mortara (UNIFESP), a quem somos gratos. Futuramente, para melhor caracterização das organelas reconhecidas pelo soro anti-epimastigotas, a imagem deverá ser obtida por imunomicroscopia eletrônica.

Figura 31 - Localização subcelular de *TcABCG1* em formas epimastigotas da cepa Sílvia X10 cl1 incubadas com soro anti-proteína recombinante (diluição 1:80). Imagens por microscopia confocal. (A) corante DAPI: marcação do cinetoplasto (K) e núcleo (N); (B) segundo anticorpo marcado com FITC; (C) fase; (D) fusão das imagens com DAPI e FITC.

5 DISCUSSÃO

5.1 O transportador *TcABCG1*

Neste estudo caracterizamos alguns aspectos do gene de um transportador ABC da subfamília G de *T. cruzi*, que por ser o primeiro gene desta subfamília estudado no parasita, recebeu a denominação *TcABCG1*. O interesse no estudo desse gene foi ocasionado pelas evidências experimentais que apoiam a hipótese de que o transportador *TcABCG1* participaria no processo de resistência natural que algumas cepas de *T. cruzi* apresentam para os dois únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, BZ e NFX (ver Introdução). De fato, a transfecção de uma cepa sensível a BZ (cepa CL Brener) com genes *TcABCG1* derivados de duas cepas resistentes à droga (cepa Silvio X10 cl1 e cepa YuYu) promoveu um incremento da ordem de 30% na resistência da cepa CL Brener a BZ. Além disto, CL Brener transgênico também apresentou um aumento na resistência a NFX de mesma ordem de grandeza (Rafael Araújo, manuscrito em preparação). Os dados sugeriram que o transportador *TcABCG1* seria um dos elementos atuantes na resistência natural aos dois fármacos. Esta conclusão corrobora estudos de Filardi e Brener (1987) em modelo murino infectado com 47 cepas de *T. cruzi* isoladas de diversas fontes. Os autores verificaram que, após tratamento dos camundongos com BZ ou NFX, na maior parte das cepas havia um paralelismo na eficácia das duas drogas. Ou seja, determinada cepa era sensível a NFX e BZ, ou resistente a ambos. O fato de *TcABCG1* atuar na resistência aos dois fármacos pode ser justificado por serem ambos nitroderivados: NFX, um nitrofurano e BZ, um nitroimidazol.

Transportadores ABC desempenham um papel importante no transporte de vários substratos através de membranas celulares (ver Introdução). A atividade de transportadores ABC representa uma das estratégias biológicas de defesa da célula contra o ataque citotóxico de xenobióticos. Nesse sentido, transportadores ABC atuam no fenômeno de resistência a fármacos em diversos tipos de câncer, em bactérias, fungos e protozoários patogênicos, removendo a droga do local onde se encontra seu alvo celular (Blackmore et al., 2001; Borst e Elferink, 2002; Deeley e Cole, 1997; Lage, 2003; Klokouzas et al., 2003; Van Veen e Konings, 1997). As subfamílias de transportadores humanos ABCB e ABCC são as mais representadas

na resistência a droga (Lage, 2003). Por outro lado, um dos transportadores mais bem estudados, responsável pela resistência do câncer de mama a mitoxantrona, doxorubicina e topotecan, é o transportador ABCG2, também denominado BCRP. Alguns estudos também apontam que a expressão de BCRP estaria associada também à leucemia mielóide aguda resistente em idosos e crianças. A expressão elevada de ABCG2 em placenta normal sugere que esta molécula tenha um papel fisiológico na barreira placentária (Allikmets et al., 1998; Lage e Dietel, 2000; Miyake et al., 1999). O conjunto de fatores acima justificou a importância de caracterizar o gene e, indiretamente, a proteína por ele codificada, em diversas cepas de *T. cruzi*, pertencentes a diferentes DTUs e cuja suscetibilidade natural a BZ foi determinada. Esta foi estabelecida por nós na forma epimastigota de nove cepas: três da DTU TcI; duas de TcII; e uma de cada DTU TcIII, TcV; TcVI e Tcbat. Verificamos que as três cepas TcI são resistentes a BZ (critério exposto em Resultados). Lamentavelmente não tínhamos à disposição outras cepas TcI, suscetíveis a BZ. Das duas cepas TcII, uma mostrou-se resistente (VL10) e outra, sensível (Berenice 62). A cepa TcIII isolada de tatu (cepa 893) mostrou ser a mais resistente a BZ (CI_{50} $74,9 \pm 7,6$ μ M). Os representantes das DTUs TcV, TcVI e Tcbat mostraram ser sensíveis à droga.

Alguns estudos reportam que isolados da DTU I são mais resistentes a BZ do que isolados de outras DTUs (Toledo et al., 2003; 2004), ao passo que outros autores não observaram correlação entre o grau de suscetibilidade a BZ e a DTU (Moreno et al., 2010; Villarreal et al., 2004).

O gene *TcABCG1* de 14 cepas foi clonado e sequenciado. Para as cepas cuja suscetibilidade a BZ havia sido determinada, realizamos uma busca de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) potencialmente associados ao fenótipo de resistência a BZ. Esta análise não evidenciou nenhum SNP característico.

No gene *ABCG2* humano foram descritos vários SNPs que afetam seu nível de expressão, função, especificidade para o substrato e localização celular. Os SNPs em *ABCG2* promovem variações não sinônimas de aminoácidos, localizadas seja na região NBD, como no TMD (Kondo et al., 2004; Morisaki et al., 2005; Yanase et al., 2006). Passamos então a analisar se variações de aminoácidos de *TcABCG1* teriam alguma associação com a suscetibilidade ou resistência a BZ. Notamos que a sequência proteica mais divergente é a das cepas TcI (todas resistentes a BZ). Variações não sinônimas conservadas nas três cepas TcI, e que variam na maior

parte das cepas, são observadas nas posições 48, 50, 124 e 376, situadas na região do NBD. Conforme esperado, nenhuma das variações ocorre nos motivos Walker A, Walker B e assinatura ABC. Na região do TMD, as variações ocorrem nas posições 495, 598, 604 e 635. Nenhuma das variações ocorre nas alfa-hélices que atravessam a membrana. Segundo Lage (2004), a região do TMD determina a especificidade para a molécula de substrato a ser transportada. O envolvimento das variações não sinônimas presentes no transportador *TcABCG1* de cepas TcI na resistência a BZ merecerá estudos futuros.

No alinhamento de aminoácidos do transportador *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi* (Figura 25) chama a atenção o fato de a cepa 893 (TcIII), a mais resistente a BZ, apresentar variações de aminoácidos diferentes daquelas observadas nas cepas TcI, também resistentes a BZ. A sequência proteica da cepa 893 (TcIII) é idêntica à sequência proteica do haplótipo NEsomo de CL Brener (TcVI), cepa suscetível a BZ. Isto é explicado pelo fato de CL Brener ser um híbrido, tendo como parental próximo um representante de TcIII (ver Discussão a seguir). Por outro lado, a conservação de sequência primária não explica a diferença de suscetibilidade a BZ entre as duas cepas.

A comparação da sequência proteica do transportador das duas cepas TcII: VL10 (resistente) e Berenice 62 (sensível) também mostra uma total conservação, que não explica a diferença de fenótipo.

Desta forma, partindo da hipótese que *TcABCG1* esteja envolvido no fenômeno de resistência a BZ em *T. cruzi*, outros fatores, que não a sequência de aminoácidos, poderiam estar atuando. Dentre eles pode-se supor: a abundância dos transcritos; a eficiência de tradução; e a formação do transportador completo (dimerização).

Uma série de revisões descreve os mecanismos de controle da expressão gênica em tripanossomatídeos (revisões mais recentes De Gaudenzi et al., 2013; Fernández-Moya e Estévez, 2010; Martínez-Calvillo et al., 2010 ver abaixo). É amplamente reconhecido que a transcrição de genes codificadores de proteína dos tripanossomatídeos é policistrônica, seguida por um processo de *trans-splicing* para originar transcritos independentes. A regulação da expressão gênica ocorre por eventos pós-transcricionais. Proteínas que reconhecem elementos de RNA localizados preferencialmente na região 3'-UTR dos transcritos atuam regulando sua

abundância, aumentando sua estabilidade ou degradação. Análises *in silico* em bancos de dados dos genomas de tripanossomatídeos indicam que uma regulação epigenética também teria um papel importante na expressão gênica. Em estudos futuros será interessante verificar a abundância de transcritos de *TcABCG1* nas cepas estudadas. Também seria de interesse verificar a estrutura da região 3'-UTR dos transcritos.

Transportadores da subfamília G são meio-transportadores que necessitam dimerizar para formar um transportador ativo. O transportador ABCG2 humano forma homodímeros, enquanto os transportadores ABCG5 e ABCG8 humanos unem-se para formar complexos heterodiméricos (Cserepes et al., 2004; Koshiba et al., 2008; Kusuhara e Sugiyama, 2007; Velamakanni et al., 2007). Para verificar a relação de *TcABCG1* com os transportadores ABCG humanos, realizamos uma análise pelo método de *neighbour-joining* com a sequência proteica completa dos transportadores (Figura 32). Os dados sugerem que o transportador de *T. cruzi* estaria mais relacionado aos transportadores ABCG5, ABCG8 e ABCG2 humanos. Em hepatócitos, os transportadores ABCG5 e ABCG8 atuam no efluxo do colesterol na bile (Graf et al., 2003).

Figura 32 - Árvore gerada pelo método de *neighbour-joining* com a sequência proteica completa dos transportadores ABC da subfamília G de humanos ABCG1 (P45844), ABCG2 (AAP44087), ABCG4 (NP_071452.2), ABCG5 (NP_071881), ABCG8 (NP_071882.1) e o transportador *TcABCG1* de *T. cruzi* (haplótipo Esmo). Os números nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) (1000 pseudo-réplicas).

Na dimerização de ABCG2 humano pontes S-S da Cys603 ligam os dois monômeros, ao passo que os resíduos Cys592 e Cys608 formam pontes S-S intramoleculares, importantes para a estabilidade do transportador (Cserepes, et al., 2004; Kusuhara e Sugiyama, 2007; Koshiba et al., 2008; Velamakanni et al., 2007). Uma busca na estrutura de *TcABCG1* indicou a presença de Cys nas posições 602 e 612, conservada em todas as cepas. Nas proximidades da posição 592 não foram encontradas cisteínas.

Uma pergunta interessante, difícil de ser comprovada experimentalmente, é se na cepa CL Brener (*TcVI*) transfectada com o gene *TcABCG1* de cepas *Tcl* há formação de dímeros híbridos do transportador.

Análises genealógicas com a sequência nucleotídica de *TcABCG1* de 14 cepas indicaram a formação de clados que reúnem cepas de mesma DTU: *Tcl*, *TcII*, *TcIII* e *Tcbat*. Os dois haplótipos das cepas híbridas (*TcV* e *TcVI*) agruparam-se ou mostraram-se mais próximos aos clados *TcII* e *TcIII*. Estas conclusões corroboram integralmente análises genealógicas realizadas com diferentes genes (ver, por exemplo, Tomazi et al., 2009 e referências citadas).

A genealogia em rede de *TcABCG1* apresenta várias anastomoses entre os clados. Este aspecto é típico da ocorrência de taxas elevadas de trocas genéticas (hibridização e/ou recombinação) em determinado organismo. Em *T. cruzi* genealogias em rede foram definidas para genes de actina, fator de alongação 1- α (EF-1 α); dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e tripanotona redutase (TR) (Tomazi et al., 2009) e DNA satélite de 195 pb (Ienne et al., 2010), dentre outros. Os dados derivados da análise do DNA satélite sugerem fortemente que *TcIII* seja um híbrido, com dois conjuntos distintos de sequências e que trocas genéticas entre os parentais *Tcl* e *TcII* ocorreram no *pedigree* das DTUs *TcV* e *TcVI* (Ienne et al., 2010).

No presente estudo, a presença de recombinação intragênica em *TcABCG1* foi investigada pelo método de *Bootscan* manual implementado no programa RDP3. A mesma abordagem foi utilizada para determinar os padrões de recombinações intragênicas em quatro genes nucleares codificadores de proteína (Carmona-Ferreira e Briones, 2010). A análise de recombinação intragênica foi realizada nos dois haplótipos de *TcABCG1* das cepas híbridas *TcV* e *TcVI*, usando-se diferentes pares de genes parentais. Para as cepas *TcV*, os dados indicam que o haplótipo A é

inteiramente derivado de TcII. Para o haplótipo B, notam-se regiões próximas a TcI e TcII com valores de *bootstrap* médio. As regiões próximas a TcI são menos abundantes, mas presentes, sugerindo um evento de recombinação antigo, conforme postulado pelo modelo de “Duas Hibridizações” (Westenberger et al., 2005). Usando-se como parentais cepas TcII e TcIII, no início da sequência nota-se um longo trecho próximo a TcII, ao passo que o meio da sequência é próximo a TcIII, com altos valores de *bootstrap*. Isto indicaria uma hibridização mais recente com ancestral TcIII, também apoiando o modelo de “Duas Hibridizações”. Corroborando esta hipótese no haplótipo B notam-se dois pontos claros de recombinação entre as sequências de TcII e TcIII.

Para os haplótipos de CL Brener, verificamos que o haplótipo Esmo é inteiramente TcII, como observado para o haplótipo A de TcV; ao passo que o haplótipo NEsmo é inteiramente TcIII. Isto reforça a hipótese de que as cepas TcV e TcVI tiveram uma evolução independente após o evento de troca genética entre TcII e TcIII (Sturm e Campbell, 2010).

Os dados da análise de recombinação intragênica para os haplótipos de cepas híbridas apoiam integralmente as conclusões derivadas das análises genealógicas. Ou seja, os haplótipos Esmo e NEsmo de CL Brener agrupam-se, respectivamente, com os clados TcII e TcIII; os haplótipos A das cepas TcV agrupam-se próximos a TcII, ao passo que os haplótipos B estão mais próximos ao clado de TcIII.

Tendo em vista a natureza híbrida controversa de TcIII e TcIV (ver em Zingales et al., 2012), analisamos a possível presença de recombinação intragênica utilizando as cepas parentais TcI e TcII. Nas duas DTUs observam-se algumas regiões próximas a TcI e outras próximas a TcII, que contrariam a hipótese de que TcIII seria um grupo ancestral (Freitas et al., 2006).

Analisamos recombinação intragênica no grupo de cepas Tcbat, utilizando três pares de parentais putativos: TcI-TcII; TcII-TcIII e TcI-TcIII. Interessantemente, os dados sugerem que Tcbat pode ter sido originado de evento(s) de recombinação entre TcI e TcIII. Nas genealogias apresentadas, a sequência de Tcbat está mais próxima de TcI, coincidindo com conclusões anteriores (Marcili et al., 2009a; Cavazzana et al., 2010). Os autores concluíram que Tcbat seria um grupo de cepas independente, que poderia constituir a DTU TcVIII. Por outro lado, as evidências

aqui apresentadas que sugerem que Tcbat seja um híbrido resultante da recombinação entre TcI e TcIII, merecem estudos posteriores. Lamentavelmente há poucos genes de cepas Tcbat depositados em bancos de dados. Realizamos estudos de recombinação intragênica na sequência parcial do gene da latosterol redutase (735 pb) de uma cepa Tcbat (Cosentino e Agüero, 2012), utilizando como parentais pares de cepas TcI-TcII; TcII-TcIII e TcI-TcIII (Figura 33). Os dados sugerem novamente eventos de recombinação entre TcI e TcIII, que merecem ser explorados por outras abordagens.

Figura 33 - Análise de recombinação intragênica na sequência parcial do gene da latosterol redutase de Tcbat pelo método de *Bootscan* manual implementado no programa RDP3. Cepas parentais: TcI (linha vermelha), TcII (linha verde) e TcIII (linha azul).

Neste estudo também propusemos determinar a localização subcelular do transportador *TcABCG1*. Para esta finalidade, inicialmente obtivemos a proteína recombinante (~26 kDa), representando uma região de ~730 pb do NBD, que continha os motivos Walker A e B e a assinatura ABC. Conforme descrito em Resultados, foram feitas algumas tentativas de clonagem em diferentes vetores de expressão, mas em todos os casos a proteína foi expressa sob forma insolúvel. Corpos de inclusão obtidos no sistema pQE-30Xa – *E. coli* XL1 Blue MRF foram parcialmente purificados. O padrão eletroforético em SDS-PAGE mostra a predominância da proteína recombinante na preparação que foi utilizada na obtenção de antisoros em camundongos. Paralelamente, como controle, foi obtido

um soro policlonal contra formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1, rompidas por sonicação. A análise por Western blot mostrou que o soro anti-epimastigotas reconhece vários antígenos, ao passo que o soro contra a proteína recombinante reconhece um antígeno majoritário de ~76 kDa, que corresponderia ao monômero de *TcABCG1*. Tendo em vista a existência de vários transportadores ABC em *T. cruzi* (Leprohon et al., 2006), a reação do soro imune com uma única banda sugere fortemente a especificidade do soro anti-*TcABCG1*.

Com esse antisoro realizamos ensaios de imunofluorescência indireta. As imagens em microscópio de imunofluorescência convencional e por imunomicroscopia confocal sugerem que o transportador esteja localizado majoritariamente em vesículas intracelulares. A confirmação desta conclusão deverá ser obtida futuramente por imunomicroscopia eletrônica em colaboração com a Dra. Thaís Souto-Padrón (UFRJ), especialista nessa técnica.

O mecanismo de ação do BZ não está completamente esclarecido. Por outro lado, está claro que BZ é uma pró-droga que necessita ser ativada para exercer sua ação. No processo de ativação atuam nitrorredutases (Hall e Wilkinson, 2012). Dois mecanismos de ativação foram propostos. O primeiro, envolve a ação de uma nitrorredutase de tipo II, que geraria um estresse oxidativo no parasita, via formação do ânion superóxido. O segundo, envolve a ação de uma nitrorredutase mitocondrial de tipo I, resultando na formação de vários metabólitos citotóxicos. Um desses produtos, glioxal, formaria adutos com várias moléculas biológicas, sendo responsável pelos vários efeitos pleiotrópicos observados, dentre os quais, inibição da síntese de DNA e de proteínas (Hall e Wilkinson, 2012). Uma possibilidade a ser explorada é que *TcABCG1* atue sequestrando BZ em vesículas, impedindo/dificultando a ação de nitrorredutases. NFX também é uma pró-droga ativada pelas mesmas nitrorredutases (Hall e Wilkinson, 2012). Esta evidência poderia justificar o fato de a super-expressão de *TcABCG1* aumentar a resistência seja BZ como a NFX.

5.2 Ortólogos de *TcABCG1* em tripanossomatídeos

Na Introdução foi mencionado que a sequência proteica completa do transportador *TcABCG1* de *T. cruzi* apresenta elevada similaridade com

transportadores da subfamília G de espécies de *Leishmania* e de tripanossomas africanos (ver Tabela 2). Para estudar as relações entre esses transportadores realizamos uma análise filogenética seguindo a abordagem utilizada por Leprohon et al. (2006), como segue. Com base na informação relativa à sequência proteica dos transportadores ABCG (ver número de acesso do GenBank na Tabela 2), extraímos as sequências correspondentes ao NDB. Estas foram alinhadas usando Clustal W e editadas com o software BioEdit. O alinhamento múltiplo resultante foi submetido à análise usando os métodos de *neighbor-joining* (Figura 34) e máxima parcimônia (Figura 35).

Figura 34 - Árvore gerada pelo método de *neighbour-joining* com a sequência de aminoácidos do NBD do transportador *TcABCG1* de *T. cruzi* e de transportadores da subfamília G de outros tripanossomatídeos. Os números nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) (1000 pseudo-réplicas). A barra indica o número de substituições por sítio.

Figura 35 - Árvore gerada pelo método da máxima parcimônia com a sequência de aminoácidos do NBD do transportador TcABCG1 de *T. cruzi* e de transportadores da subfamília G de outros tripanossomatídeos. Os números nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) (1000 pseudo-réplicas).

Em ambas as árvores observa-se uma boa separação dos clados que contém as sequências dos transportadores de *T. cruzi*, espécies de *Leishmania* e espécies de tripanossomas africanos. O clado de *T. cruzi* (cepa CL Brener e *T. cruzi marinkellei*) é igualmente distante dos clados de *Leishmania* e de tripanossomas africanos, sugerindo que os transportadores de *T. cruzi* seguiram uma história evolutiva diferente, após a separação das espécies.

Para estudos futuros sugerimos caracterizar os transportadores dos tripanossomatídeos patogênicos, ortólogos de TcABCG1, quanto ao seu potencial envolvimento na resistência a drogas.

REFERÊNCIAS¹

- Alibu VP, Richter C, Voncken F, Marti G, Shahi S, Renggli CK et al. The role of *Trypanosoma brucei* MRPA in melarsoprol susceptibility. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;146: 38-44.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998;58:5337-9.
- Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, et al. Pfmdr1 and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:641-7.
- Anônimo. Recommendations from an international Symposium to commemorate the 90th anniversary of Discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:429-32.
- Araújo RGA de. Transportador ABC e resistência a benznidazol em *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-21032012-143227/pt-br.php>> [2013 jun 23].
- Bahia MT, de Andrade IM, Martins TAF, do Nascimento AFS, et al. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1870.
- Balzi E, Goffeau A. Genetic and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994;1187:152-62.
- Benitez AJ, McNair N, Mead J. Modulation of gene expression of three *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette transporters in response to drug treatment. *Parasitol Res*. 2007;101:1611-6.
- Blackmore CG, McNaughton PA, van Veen HW. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol Membr Biol* 2001;18(1):97-103

¹ De acordo com:

International committee of Medical Journal Editors. [Internet], Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 jul].

- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop*. 1996;61:31–40
- Bonafonte MT, Romagnoli PA, McNair N, Shaw AP, Scanlon M, Leitch GJ, et al. *Cryptosporidium parvum*: effect of multi-drug reversing agentson the expression and function of ATP-binding cassette transporters. *Exp Parasitol*. 2004;106:126-34.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002;71:537-92.
- BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;158:176–88.²
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72: 248-54.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347-82.
- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F,et al. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop*. 1998;71(3):269-83.
- Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implication to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;104:219–32.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: How Many Relevant Phylogenetic Subdivisions are There? *Parasitol Today*.1998;14(5):178-9.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;111:95–105.
- Buckner SF. Sterol 14-Demethylase Inhibitors for *Trypanosoma cruzi* Infections. *Adv Exp Med Biol*. 2008;625:61-80

- Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop*. 1990;47:35-45.
- Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonça MAG, Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J Bioenerg Biomembr*. 2009;41:299-308.
- Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:418–24.
- Castanys-Muñoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S.. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol*. 2007;64:1141–53.
- Cavazzana M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira, ACV, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cytb) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol*. 2010;40:345–55.
- Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.ge., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1:159-218.
- Chapman MD, Baggaley RC, Godfreyfausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, Miles MA. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco – isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool*. 1984;31:482–6.
- Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;150:378-83.
- Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1.; an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003. v. 130, p. 83-90.
- Coelho AC, Tosi LR, Cotrim PC. Mapping of a *Leishmania major* gene/locus that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46:109-12.

Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. et al. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 3030-2.

Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):e1777. doi: 10.1371/journal.pntd.0001777

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:549-54.

Cserepes JZ, Szentpetery LS, C. Ozveg-Laczka T, Langmann G, Schmitz H, Glavinas I Klein, et al. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004;320:860–7.

Dallagiovanna B, Castanys S, Gamarro F. *Trypanosoma cruzi*: sequence of the ATP-binding site of a P-glycoprotein gene. *Exp Parasitol*. 1994 Aug;79(1):63-7.

Dallagiovanna B, Gamarro F, Castanys S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Jan;75(2):145-57.

DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*. 2004 Jan;92(2):113-20.

De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996 Nov;23;348(9039):1407-13.

Dean M. The Human ATP-BindingCassette (ABC) Transporter Superfamily. NCBI. 2002

Descoteaux S, Ayala P, Samuelson J, Orozco E. Increase in mRNA of multiple *Eh* *pgp* genes encoding Pglycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene*. 1995;164:179-84.

Deeley RG, Cole SPC. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol*1997;8(3):193-204.

Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*. 2009;32:n9:10:2444-57.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15665–70.

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi): [cited 2013 Mai 8]. Available from: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>

Ejendal KFK, Diop NK, Schweiger LC, Hrycyna CA. The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding *Protein Sci*. 2006;15:1597–07.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul;15:309(5733):409-15.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop*. 2009;110:15-21

Felsenstein, J. (Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 1981;17:368–76.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med*. 2001;95:97–9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:807-11.

Fernández-Moya SM, Estévez AM.. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *WIREs RNA*. 2010;1:34-46.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):755-9.

Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool*. 1971;20:406-16.

Floeter-Winter LM, Souto RP, Stolf BS, Zingales B, Buck GA. *Trypanosoma cruzi*: can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker for speciation? *Exp Parasitol*. 1997 Jul;86(3):232-4.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogen*. 2006;2:226-35(e24).

Goijsman SG, Frasch, AC, Stoppani A, O Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochem Pharmacol*. 1985;34:1457-61.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*. 1998;8:195-202.

Ienne S, Pedroso A, Carmona EFR, Briones MR, Zingales B. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol*. 2010 Jul;10(5):601-6.

ImageJ - Image Processing and Analysis in Java from National Institutes of Health., 2004. Available from: <http://imagej.nih.gov/ij> [2011 Sep 5].

Hardwick LJ, Velamakanni S, van Veen HW. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles: a brief overview. *Br J Pharmacol*. 2007;151:163–74.

Hanjiang Yang, Tingting Zhang, Kun Xu, Jie Lei, Ling Wang, Zhanwei Li, Zhiying Zhang. A novel and convenient method to immunize animals: Inclusion bodies from recombinant bacteria as antigen to directly immunize animals. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(41):8146-50.

Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Oct;11(10):918-26.

Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007 Apr;446(7137):749-57.

Huson, D.H., Bryant, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23:254–67.

Igarashi KF, Aoki H, Mamitsuka K, Kuma M, Kanehisa. The evolutionary repertoires of the eukaryotic-type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol*. 2004;21(11):2149–60.

- Jin L, Nei M. Limitation of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 1990;7:82–102.
- Koshiba S, An R, Saito H, Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T. Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica.* 2008;38(7–8):863–88
- Kusuhara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch.* 2007;453:735–44.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
- Lage H, Dietel M. Effect of the breast-cancer resistance protein on atypical multidrug resistance. *Lancet Oncol.* 2000;1:169
- Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Sep;22(3):188–99.
- Lara FA, Sant'anna C, Lemos D, Laranja GA, Coelho MG, Reis Salles I, et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 30;355(1):16–22.
- Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell.* 2006 Oct;5(10):1713–25.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Tox Appl Pharmacol.* 2005;204(3):216–37.
- Lewis K. Multidrug resistance pumps in bacteria: variation on a theme. *Trends Biotechnol. Sci.* 1994;19:119–23.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Intern J Parasitol.* 2009;39:1305–17.
- Liu S, Zhou S, Tian L, Guo E, Luan Y, Zhang J, et al. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 2011;12:491.
- Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e510.

Lumsden WHR, Herbert WJ, McNeillage GJC. Techniques with trypanosomes. Edinburgh & London: Churchill Livingstone;1973.183 p.

Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:7396-401.

Maia da Silva F , Marcili A , Lima L, Cavazzana M.Jr, Ortiz P A , Campaner M., et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced leader gene sequences. Acta Trop. 2009;109:199–207.

Marcili A, Lima L, Cavazzana MJ, Junqueira ACV, Veludo HH, da Silva FM, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 2009a;136:641–55.

Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. Infect Genet Evol. 2009b;9:1265–74.

Marin-Neto JA, Rassi Junior A, Avezum JR, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl. I):319-24.

Maser P, Kaminsky R. Identification of three ABC transporter genes in *Trypanosoma brucei* spp. Parasitol Res. 1998;84:106-11.

Matovu E, Seebeck T, Enyaru JC, Kaminsky R. Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp. The causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. Microbes Infect. 2001 Jul;3(9):763-70.

Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. J Infect Dis. 2012 Jul;15:206(2):220-8.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):8-13.

Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978 Apr;272(5656):819-21.

Moreno VM. Microarranjos de DNA para análise da expressão gênica em cepas de *Trypanosoma cruzi* suscetíveis e resistentes a benznidazol. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-31032009-104038/pt-br.php> [2013 jun 23].

Moreno M, D'Avila D A, Silva MN, Galvao LM, Macedo AM, Chiari E, et al. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Nov;105(7):918-24.

Murta SM, Nogueira FB, Dos Santos PF, Campos FM, Volpe C, Liarte DB, et al. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Tropica*. 2008;107(1):59-65.

Nair S, Nash D, Sudimack D, Jaidee A, Barends M, Uhlemann AC, et al. Recurrent gene amplification and soft selective sweeps during evolution of multidrug resistance in malaria parasites. *Mol Biol Evol*. 2007;24:562-73.

Ouellette M, Borst P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol*. 1991;142:737-46.

Ouellette M, Legare D, Haimeur A, Grondin K, Roy G, Brochu C, et al. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat*. 1998 Mar;1(1):43-8.

Perkins ME, Volkman S, Wirth DF, Le Blancq SM. Characterization of an ATP-binding cassette transporter in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;87:117-22.

Pinto CM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1328–32.

Polak A, Richle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72:45-54.

Posada D, Crandall KA. Model Test: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14:817–8.

Pozza A, Perez-Victoria JM, Sardo A, Ahmed-Belkacem A, Di Pietro A. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(16):1912-22.

Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, et al. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2943-9.

Rassi Júnior A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010 Apr; 17;375(9723):1388-402.

Rassi Júnior A, Rassi A, Rezende MJ. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):275-91. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002.

Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, et al. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* 2001 Oct;15;20(20):5615-25.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4,406–25.

Salminen M, Carr J, Burke D, McCutchan, F. Identification of breakpoints in inter genotypic recombinant sof HIV type 1 byboot scanning. *AIDS Res Hum. Retrovir* 1995;11:1423–5.

Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Oct;167(2):81-94.

Shahi SK, Krauth-Siegel RL, Clayton CE. Overexpression of the putativethiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1129-38.

Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine.; lumefantrine.; halofantrine.; quinine.; and artemisinin. *J Infect Dis.* 2006;194:528-35.

Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Chemotherapy with benznidazole in children in undetermined phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:526-9.

Sosa-Estani S, Dri L, Touris C, Abalde S, Dell'arciprete A, Braunstein J. Vectorial and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Las Lomitas, Formosa. *Medicina (B Aires)*.2009;69:424-30.

Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62:45-52.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*.1996;83:141-52.

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003;33:269-79.

Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2010 Jul-Aug;115(1-2):35-43.

Su K, Sabeva NS, Liu J, Wang Y, Bhatnagar S, van der Westhuyzen DR, et al. The ABCG5 ABCG8 sterol transporter opposes the development of fatty liver disease and loss of glycemic control independently of phytosterol accumulation. *J Biol Chem*. 2012;278:48275–82.

Swofford DL. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b10a. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 1998.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetic, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*. 1986;42:277–92.

Tibayrenc M. Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III*. 1995 Jan;318(1):135-9.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol*. 1998;28:85–104.

Torres C, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*. 2004 Nov;54(3):632-46

Toledo MJO, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:223-30.

Toledo MJO, Tafuri WL, Bahia MT, Tibayrenc M, Lana M. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Res Adv Antimicrob Agents Chemother*. 2004;4:11-22.

Tomazi L, Kawashita SY, Pereira PM, Zingales B, Briones MR. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genet Mol Res*. 2009;8:458–76.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*. 2010 Jul-Aug;115(1-2):55-68.

Van Veen HW, Konings WN. Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin Cancer Biol*. 1997;8(3):183 - 91.

Velamakanni S, Wei SL, Janvilisri T, van Veen HW.. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles: a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2007;39:465–71.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;144:724-34.

Villarreal D, Barnabé C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol*. 2004;108:24-31.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide-binding fold. *EMBO J*. 1982;1(8):945-51.

Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 2009;10:255.

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell D, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005;171,527-43.

Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol*. 2006;36:337-46.

WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. World Health Organization. Control of Chagas disease: Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva; 2002.109 p.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Apr 1;105(13):5022-7.

Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FRC, Norval S, et al. The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. *Sci Transl Med*.2012;4:19re1.

Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*. 2008;57(2):105-9.

Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontieres. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7):e488.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*. 1998;28(1):105-12.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.1999;94(Suppl):1:159-64.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051-4.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*.2011;6b:44-8.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Texeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Gent Evol*. 2012;12:240-53.

APÊNDICE - Sequência nucleotídica do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*

>Tcl_Col

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCTGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTTC
 ATCAGGGGCTCCGTGCGCGAGTTGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAAACCAATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTAGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCACCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGAGGTGCGATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACCTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCCAACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAATT
 CCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTTTCCGATGCGCGTATTTTTTGCCTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTT
 TATCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAGTTGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTCAAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCGC
 TTGCAATGGTCCGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTATTGGTTGGAGAAGCCAT
 CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCAACCACATTCCGGTGTGATGAT
 AGAGGCAAACCGCCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGGTT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTATATATTGCTTTCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>Tcl_Sil

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCTGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTTC
 ATCAGGGGCTCCGTGCGCGAGTTGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAAACCAATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCACCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACTATTCACCAACCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGAGGTGCGATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATATTTTGAAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CTGAACGATATACGCCAAGCGATTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAAATTTCCAAGGTACTGGTTAA
 AAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCCAACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATCC
 CTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAATTC
 CAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGGCT
 GCGTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCGCG
 AGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGCA

AGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCCTTTATTTTCTTTTTATCAAAGACC
 CTGGTGGAGTTTCCGATGCGCGTATTTTTTGCCTTCTTGAGTGCTGATTTTATACTGGATGGTGGGTCTTT
 ATCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAAGTGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCGC
 TTGCAATGGTGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTATTGGTTGGAGAAGCCAT
 CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCCGAATGAATTTAAGCATATCAACCACATTCCGGTGTGATGAT
 AGAGGCAAACCGCCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGGT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>Tcl_Yu

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTTC
 ATCAGGGGCTCCGTGCGCGAGTTGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAAACCAATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGCTCTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCACCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACTATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGAGGTCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGTACTGGTTA
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAATT
 CCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCCTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTTTCCGATGCGCGTATTTTTTGCCTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTT
 TATCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAAGTGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTCAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCGC
 TTGCAATGGTGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTATTGGTTGGAGAAGCCAT
 CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCCGAATGAATTTAAGCATATCAACCACATTCCGGTGTGATGAT
 AGAGGCAAACCGCCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGGT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TclI_Berenice 62

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTCC
 ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTAAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTACCGCGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGTGAGACCAATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGCTCTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTACAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT

GGGGGTCGATGTGCTTACCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCCTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAACACGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCTGAGTCTCCACCGCGAAGAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCTGCTGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCGC
 GAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGC
 AAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTTATTTTCTTTTATCAAAAACC
 CTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTTTTGCCTTTCTTGAGTGTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTTTTTA
 CCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTCTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTGG
 GTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGCTGCCGCT
 TGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCATC
 CTTTATTCTGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGGTA
 GAGGCAAACCAACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACTTGGGTTT
 CAGCAGAAACAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 CCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcII_VL10

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACCCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGA
 CCAAATCGCGTGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTC
 CATCAAGGGCTCCGTGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTAT
 TCCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCAGCAAAAATTTCTTTCGCGCCTCACAGGAACAG
 GTTACCGTACAGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTC
 TGACCGACTTAAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGCACTTGGAGTACAAGC
 GTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGAAGACGACATTCTCTACCACGGGCAACACCCGAAGATT
 CCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTT
 TGGAGGAATTACGCCTTGTCCTACTGCCGCGAGACCATTTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTCAG
 GTGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAAC
 CCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACAGGCC
 GCACGGTGATTTACACCATTACCCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCAC
 TGGGGGTCGATGTGCTTACCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCCTG
 TCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTT
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAACACGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAAT
 CCCTCTGAGTCTCCACCGCGAAGAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAA
 TTCCAGGAGCTTTTTCTGCTGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAG
 GCTGCCTTCTTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTTTTGCCTTTCTTGAGTGTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTTTTT
 ACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTCTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGCTGCCGC
 TTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTTCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAACCAT
 CCTTTATTCTGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGG
 TAGAGGCAAACCAACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACTTGGGTT
 TCAGCAGAAACAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcIII_893

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACCTCCAGCTCCGCCTCATCATTGGAGTCTGACGA
 CCAAATCGCGCCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCT
 CCATCAAGGGCTCCGTGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTA
 TTCCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGTACGAAAATTTCTTTCGCGCCTCACAGGAACAG
 CGTTGCCATCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCT

CTGACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAG
 CGTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGAT
 TCCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACT
 TTGGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGGCCTTTTCG
 GGTGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAA
 CCCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACTGGC
 CGCACGGTGATTTACACCATTACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCA
 CTGGGGGTGCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTT
 GTCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGT
 TAAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAAT
 CCCTCCGAGTCTCCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAA
 TTCCAGGAGCTTTTCGTCGTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTCACATTTTATACAG
 GCTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAGGATC
 GCGAGGGAGTTTTTTTCATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTAT
 GCAAGATAAGGCCTTGACGTGCGGGAGCAAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAA
 ACCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTC
 TTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTGCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTC
 TTGGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACC
 GCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGTTGGAGAAGCC
 ATCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATG
 GTAGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTGGG
 TTTACAGCAGAAGCAATATGAAAACCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTG
 GGCCGTTATTTCTTGTACTCTGCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcIII_M6241

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCCTCATCATTGGAGTCTGACGA
 ACAAATCGCGCCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTC
 CATCAAGGGCTCCGTCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTAT
 TCCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGC
 GTTACCATCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTC
 TGACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGC
 GTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATT
 CCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTT
 TGGAGGAATTACGCCTTGTCCTACTGCCGCGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTTCGG
 GTGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAAC
 CCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACTGGCC
 GCACGGTGATTTACACCATTACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCAC
 TGGGGGTGCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTG
 TCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTT
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAAT
 CCCTCCGAGTCTCCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAA
 TTCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTCACATTTTATACAG
 GCTGCTTCTTTGCTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAGGATC
 GCGAGGGAGTTTTTTTCATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTAT
 GCAAGATAAGGCCTTGACGTGCGGGAGCAAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAA
 ACCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTC
 TTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTGCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTC
 TTGGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACC
 GCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGTTGGAGAAGCC
 ATCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATG
 GTAGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTGGG
 TTTACAGCAGAAGCAATATGAAAACCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTG
 GGCCGTTATTTCTTGTACTCTGTCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcV_NR_haplótipo A

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTCC

ATCAAGGGCTCCGTGCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTAAACCTCGCGTACCCCTTAAGCTGACAGGGAAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCACCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGTGAGACCATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGCTTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCCAACAGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGGGGTGCATGTGCTTACCATGGCAGCATGGCAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCCTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAACACGGTGTGAGAACCCCAACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCTGAGTCTCCACCGCGAAGAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCGC
 GAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGC
 AAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGTTGGCTCATACTCCCCTTTATTTTCTTTTATCAAAAACC
 CTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTTTTGCCTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTTTTTA
 CCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTGG
 GTTGGCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGCTGCCGCT
 TGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCATC
 CTTTATTTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCCGGTGTGATGTA
 GAGGCAAACCACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGGTTT
 CAGCAGAAACAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCGCGGGTTGG
 CCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcV_NR_ haplótipo B

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTCC
 ATCAAGGGCTCCGTGCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTAAACCTCGCGTACCCCTTAAGCTGACAGGGAAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCACCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGCTTTTCGGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCCAACTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGGGGTGCATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAATCCGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCCTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAACATGGTGTGAGAACCCCAACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCTCCACCGCGAATAATATTGAAAGCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAG
 GCTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAGGATC
 GCGAGGGAGTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTAT
 GCAAGATAAGGCCTTGACGTGCGGGAGCAAATGTTGGCTCATACTCCCCTTTATTTTCTTTTATCAAAA
 ACCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTGCCTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTC
 TTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTC
 TTGGGTTTGGCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACC
 GCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCC
 ATCCTTTATTTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCCGGTGTGATG
 GTAGAGGCAAACCACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGG

TTTCAGCAGAAGCAATATGAAAACCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTG
GGCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcV_SO3_ haplótipo B

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTCC
ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCAGCAAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
GACCGACTTAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGTACAAGCG
TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTACCACGGGCAACACCCGAAGATTC
CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGCGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGCTTTCCGG
TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
GGGGGTGCGATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAAATCCGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
AAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
CCTCCGAGTCTCCACCGCGCAAAAAATTTGAAAGCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAAT
TCCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAG
GCTGCCCTTCTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTAGCTGGTATGCAGGATC
GCGAGGGAGTTTTTTTTCATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTAT
GCAAGATAAGGCCCTTGACGTGCGGGAGCAAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTATTTTTCTTTTTATCAAAA
ACCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTC
TTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTTACTATTTGCGGTCTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTC
TTGGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTTAAAAGTTTTGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACC
GCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGCGCAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGTTGGAGAAGCC
ATCCTTTATTTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGGTGTGATG
GTAGAGGCAAACACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGG
TTTCAGCAGAAACAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTG
GGCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcV_SO3_ haplótipo A

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
CAAATCGCGTCAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTCC
ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCAGCAAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
GACCGACTTAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGAGTACAAGCG
TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTACCACGGGCAACACCCGAAGATTC
CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
GGAGGAATTACGCCTTGCCACTGCCGTGAGACCATTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGCTGCTTTCCAGG
TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
GGGGGTGCGATGTGCTTACCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
AAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACACGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
CCTCTGAGTCTCCACCGCGCAAGAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
TCCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
CTGCCCTTCTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTAGCTGGTATGCAAGATCGC
GAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGC

AAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTTATTTTCTTTTATCAAAAACC
 CTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTCCTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTATACTGGATGGTGGGTTTTTA
 CCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTACTACTTTGCGGTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTGG
 GTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGCTGCCGCT
 TGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCATC
 CTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGTCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCCGGTGTGATGGTA
 GAGGCAAACCAACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAATTGGGTTT
 CAGCAGAAACAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTCCGCGGTTGG
 CCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcVI_CLB_Esmo

ATGTCGTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGA
 CCAAATCGCGTCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCTC
 CATCAAGGGCTCCGTCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTAT
 TCCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCAGCAAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGC
 GTTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTC
 TGACCGACTTAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGC
 GTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCACCACGGGCAACACCCGAAGATT
 CCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTT
 TGGAGGAATTACGCCTTGTCCTACTGCCGTGAGACCATTTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTTCAG
 GTGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTCTTGCTGGATGAAC
 CCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACAGGCC
 GCACGGTGATTTACACCATTACCCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCAC
 TGGGGGTCGATGTGCTTACCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCCTG
 TCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGTACTGGTT
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACACGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAAT
 CCCTCCGAGTCTCCACCGCGAAGAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAA
 TTCCAGGAGCTTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAG
 GCTGCCTTCTTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTAGCTGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTCCTTTGCTTTCTGAGTGCTGTATTTATACTGGATGGTGGGTTTTT
 ACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGCTGCCGC
 TTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTTCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAACCAT
 CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGTCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCCGGTGTGATGG
 TAGAGGCAAACCAACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAATTGGGTT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TcVI_CLB_NEsmo

ATGTCCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCCTCATCATTGGAGTCTGACGA
 CCAAATCGCGCCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCCGGATTCT
 CCATCAAGGGCTCCGTCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTA
 TTCCCGTCTCATGGCATAATTTGTCATATTCGGCAAACGGCAGCAAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGC
 GTTACCATCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTC
 TGACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGC
 GTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATT
 CCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTT
 TGGAGGAATTACGCCTTGTCCTACTGCCGCGAGACCATTTGTTGGTATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTTCGG
 GTGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAAC
 CCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACTGGCC
 GCACGGTGATTTACACCATTACCCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCAC

CGGGGGTCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCCGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTG
 TCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTT
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAAT
 CCTCCGAGTCTCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAA
 TTCCAGGAGCTTTTTCTGTCGTTTTTCCATGGATCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAG
 GCTGCCCTTCTTTCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTAGCTGGTATGCAGGATC
 GCGAGGGAGTTTTTTCATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTAT
 GCAAGATAAGGCCTTGACGTGCGGGAGCAAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAA
 ACCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTATTTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTC
 TTTACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTC
 TTGGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACC
 GCTTGCCATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCC
 ATCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATG
 GTAGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTGGG
 TTTTACGACAGAAGCAATATGAAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTG
 GGCCGTTATTTCTTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>tcbat_793

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCAAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAGTCGCATCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTTC
 ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGAAACGCCAGCTGGGGGACCTTTGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGCGCAAGACGACATCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCAATAAGTGAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGTCCACTGCCGCGAAACCAATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGTCTCTGGTCTTTCAGG
 TGGTGAACGCAAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTTCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGCATTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGGGGTCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTACTGGTTA
 AAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCTGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCCTTCTTTCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAGGATGATTAGCCGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAAATGGTTGGCTCATATTCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTCTCCAATGCGCGTATTTTTGCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCCT
 TACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCCT
 GGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCG
 CTTGCAATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCA
 TCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGA
 TAGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTGGGTT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG

>tcbat_597

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCAAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAGTCGCATCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTTC
 ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT

GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGTCCTGCGCGGAAACCATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTCAGG
 TGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGCACCTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGGGGTTCGATGTGCTTATCGTGGCAGCATGGCAAAATCCGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAGGATGATTTAGCCGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGTAAATGGTTGGCTCATATTTCCCTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CTGGTGGAGTCTCCAATGCGCGTATTTTTGCCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTTT
 ACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTG
 GGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCGC
 TTGCAATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCAT
 CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGAT
 AGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCAAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACTTGGGTTT
 CAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGGG
 CCGTTATTTCCCTGTACTCTGCGGCGCGTACAAAGTTTTAG

>tcbat_294

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
 CAAGTCGCATCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTTC
 ATCAAGGGCTCCGTGCGCGAGTTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
 CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAAATCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
 TTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
 GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTGGAGTACAAGCG
 TCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCACGGGCAACACCCGAAGATTC
 CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGRCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAATTTGTTGAGGAACTTT
 GGAGGAATTACGCCTTGTCCTGCGCGGAAACCATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTCAGG
 TGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACC
 CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAAGTGGCCG
 CACGGTGATTTACACCATTCACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGCACCTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
 GGGGGTTCGATGTGCTTATCATGGCAGCATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
 CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGTACTGGTTA
 AAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
 CCTCCGAGTCACCCACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTATGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
 TCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
 CTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAGGATGATTTAGCCGGTATGCAAGATCG
 CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
 CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATATTTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
 CCTGGTGGAGTCTCCAATGCGCGTATTTTTGCCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTT
 TACCGCCAGGCAGGAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTT
 GGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCG
 CTTGCAATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCA
 TCCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGGCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGA
 TAGAGGCAAACACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCAAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACTTGGGTT
 TCAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGGTTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGG
 GCCGTTATTTCCCTGTACTCTGCGGCGCGTACAAAGTTTTAG

>TclV_4166

ATGTCTTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAACCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACGAC
CAAATCGCGTCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATTCTCC
ATCAAGGGCTCCGTGCGCGCAGTTCGACGCCGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGACGCTTTTCTATT
CCCGTCTCATGGCATAATTTGGCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCCTCACAGGAACAGCG
CTACCGTCACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAATGCTATCTCT
GACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAAACGTCAGCTGGGGGAATTGGAGTACAAGCG
TCGTTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTACCACGGGCAACACCCGAAGATTC
CCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAATAAAATTTGTTGAGGAACTTT
GGAGGAATTACGCCTTGTCCTGCGCGAGACCATTGTTGGCATCCCTGGCCTTGCTCTGGTCTTTCAGG
TGGTGAACGTAAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTTGCGATCCTAAAATTCTGCTGCTGGATGAACC
CACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAATAACATTGCCCGAACAGGCCG
TACGGTGATTTACACCATTACCAGCCCACTGCTGAGACATTGACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTCACT
GGGGGTCGATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGT
CCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGCTCCAAGATCCAGAAAATTTCCAAGTACTGGTTA
AAAAATGGAAGAGCCATCTAAACATGGGGTGAGAACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATC
CCTCCGAGTCTCTACCGCGAAAAATATTGAAAGCTACCTTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAAT
TCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAGTCGCAATCATGTATACATTTTTTACATTTTATACAGG
CTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGTCTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCG
CGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATG
CAAGATAAGGCTTTGTACGTGCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTTATCAAAAAC
CCTGGTGGAGTTTCCAATGCGCGTGTTTTTGCCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTT
TACCGCCAGGCAGGGGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTT
GGGTTTGCCATTGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGATCGTTGCTTCCGGTACCGCACCTGTGATTTTGCTACCGC
TTGCAATGGTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAAAAGCCAT
CCTTTATTCGTCAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGAT
AGAGGCAAACACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTTGGGTTT
CAGCAGAAGCAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCGCGGTTGGG
CCGTTATTTCCCTGTACTCTGCCGCGCGTACAAAGTTTTAG