UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

AURÉLIO PEDROSO JÚNIOR

**Cariótipo molecular: uma ferramenta para o estudo analítico e
evolutivo do genoma de *Trypanosoma cruzi***

São Paulo

2005

AURÉLIO PEDROSO JÚNIOR

**Cariótipo molecular: uma ferramenta para o estudo
analítico e evolutivo do genoma de *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Bioquímica
Orientadora: Profa. Dra. Bianca Zingales

São Paulo
2005

“Feliz daquele que em si traz um Deus, um Ideal de Beleza e que a Ele obedece: Ideal de Arte, Ideal de Ciência, Ideal da Pátria, Ideal das Virtudes do Evangelho! Eis aí as fontes vivas dos grandes pensamentos e das grandes ações. E todas elas se iluminam com os reflexos do Infinito.”

Louis Pasteur

Pensando...

Ontem estive pensando
Quanto tempo se perde
Em parar para pensar
Andando embora sem sair do lugar

Ontem estive pensando
Quanto tempo se perde
Em não se pensar
naquilo que me faz sair do lugar

Hoje parei de pensar
e saio do lugar
eu saio do lugar

Aurélio Pedroso Júnior

RESUMO

PEDROSO, A. **Cariótipo molecular: uma ferramenta para o estudo analítico e evolutivo do genoma de *Trypanosoma cruzi***. 2004. 141 páginas. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Diferentes métodos de caracterização e inferências filogenéticas baseadas na sequência de alguns genes nucleares indicam que *Trypanosoma cruzi* pode ser dividido em dois grupos principais, denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Outros subgrupos de isolados foram descritos, tais como grupo de rDNA 1/2 e zimodema 3 (Z3) cuja relação filogenética com os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II ainda não está clara. O cariótipo molecular é uma ferramenta que permite abordar diferentes aspectos do genoma de organismos. Neste trabalho, caracterizamos o cariótipo molecular de 22 isolados de *T. cruzi* a partir da separação de seus cromossomos por eletroforese de campo pulsado e hibridação com sondas que representam genes codificadores de proteína e de RNA. Verificamos extenso polimorfismo cromossômico entre os isolados e que isolados pertencentes aos grupos *T. cruzi* II, rDNA 1/2 e Z3 têm cromossomos de tamanho molecular maior (até 3,5 Mb) em relação a isolados de *T. cruzi* I (até 2,8 Mb). Os dados do cariótipo molecular também foram utilizados para averiguar o significado evolutivo do polimorfismo cromossômico. As análises fenéticas foram baseadas no índice de diferença absoluta de tamanho cromossômico (aCSDI) obtido a partir da hibridação dos cromossomos com um número variável de marcadores genéticos. Inicialmente analisamos nove isolados, classificados por diferentes abordagens moleculares nos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e grupo de rDNA 1/2, este último considerado um grupo de isolados híbridos e incluído por alguns autores no grupo *T. cruzi* II. Dendrogramas de aCSDI obtidos a partir de 3 a 21 sondas definiram em todos os casos três grupos: dois correspondentes a *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e um terceiro, ao grupo de rDNA 1/2. O isolado CL Brener – organismo de referência do Projeto Genoma de *T. cruzi* – ora agrupou com *T. cruzi* II ora com o grupo de rDNA 1/2, ilustrando seu caráter híbrido. Três grupos também foram observados no dendrograma construído com dados de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) hibridados com dezoito sondas. A topologia dos dendrogramas de dados de cariótipo molecular e de RFLP é

similar, com um coeficiente de correlação significativa ($r = 0.86062$; $P < 0.0001$), corroborando uma forte estruturação dos grupos. Subseqüentemente, avaliamos a posição de isolados de Z3 em relação aos três grupos acima mencionados, uma vez que alguns autores situam Z3 no grupo *T. cruzi* II. Analisamos o padrão de hibridação de 9 sondas com os cromossomos de 19 isolados (oito de Z3, três de *T. cruzi* I, três de *T. cruzi* II e cinco de rDNA 1/2). A topologia dos dendrogramas mostrou quatro grupos correspondentes, respectivamente, a *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, grupo de rDNA 1/2 + CL Brener e Z3 (oito dos nove isolados). Este estudo também revelou que isolados híbridos têm uma maior proporção de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes em comparação com isolados não híbridos. De um modo geral, nossos resultados mostram que cromossomos são caracteres valiosos para a identificação de táxons em *T. cruzi*.

Uma vez que isolados do grupo de rDNA 1/2 apresentam cistrons ribossômicos de tipo 1 e de tipo 2, caracterizamos a distribuição dos cistrons nas bandas cromossômicas destes isolados. Verificamos que a fração majoritária dos genes de rDNA do tipo 2 está localizada na banda de 1,5 Mb e que os cistrons do tipo 1 estão localizados principalmente na banda de 1,1 Mb. Também estimamos o número de cromossomos e tamanho do genoma de quatro isolados de *T. cruzi*, com base na análise densitométrica da intensidade de fluorescência dos cromossomos corados com SYBR Green I. Para esta finalidade idealizamos um modelo matemático que permitiu estimar 52, 65, 72 e 44 cromossomos (na célula 2N), respectivamente, para CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 e Silvio X10 cl1. O tamanho do genoma dos isolados foi calculado, respectivamente em, 70 Mb, 78 Mb, 94,7 Mb e 47 Mb. Os novos aspectos do cariótipo molecular de *T. cruzi* aqui apresentados contribuirão para a compreensão da organização do genoma deste parasita e auxiliarão na atribuição de arcabouços de genes (*scaffolds*) aos cromossomos de CL Brener.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; cariótipo molecular; eletroforese de campo pulsado; análise fenética; tamanho do genoma; cistrons ribossômicos.

ABSTRACT

PEDROSO, A. **Molecular karyotype: a tool for the analytical and evolutionary study of *Trypanosoma cruzi* genome**. 2004. 141 pages. Thesis (Doctoral). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Different typing methods and phylogenetic inference based on the nucleotide sequence of few nuclear genes indicate that *Trypanosoma cruzi* can be divided into two major groups named as *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. Additional subgroups of isolates have been described, such as group of rDNA 1/2 and zymodeme 3 (Z3), whose phylogenetic relationships with the *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups is not clear. The molecular karyotype is a tool that allows investigation of particular aspects of the genome of organisms. In this study, we have characterized the molecular karyotype of 22 isolates following the separation of chromosomes by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization with probes that represent genes coding for proteins or RNA species. We observed an extensive chromosome polymorphism between the isolates and that isolates typed as *T. cruzi* II, rDNA 1/2 and Z3 have chromosome of larger molecular size (up to 3.5 Mb) in relation to *T. cruzi* I isolates (up to 2.8 Mb). Data from molecular karyotype have been also used to verify the evolutionary meaning of chromosome polymorphism. The phenetic analyses were based on the absolute chromosomal size difference index (aCSDI), calculated from the hybridization of a variable number of genetic markers. Initially, we analyzed nine isolates, classified by different molecular approaches into *T. cruzi* I, *T. cruzi* II and rDNA 1/2 groups. This latter group has been considered of hybrid genotypes and has been included by some authors in the *T. cruzi* II group. aCSDI-based dendrograms obtained from 3 to 21 probes defined in all the cases three clusters: two corresponding, respectively, to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups; and a third one, to rDNA group 1/2. CL Brener – the reference organism of the *T. cruzi* Genome Project - was alternatively positioned in *T. cruzi* II or rDNA 1/2 group clusters, illustrating the hybrid nature of this isolate. Three clusters were also observed in the dendrogram constructed with restriction fragment length polymorphism (RFLP) data from 18 probes. The topology of the chromosome and RFLP dendrograms is similar, with a

significant correlation coefficient ($r = 0.86062$; $P < 0.0001$), supporting a strong structuring of the clusters. Subsequently we evaluated the position of Z3 isolates in relation to the above-mentioned groups, because some authors clustered Z3 with *T. cruzi* II group. For this purpose we determined the hybridization pattern of 9 probes with the chromosomes of 19 isolates (eight of Z3; three of *T. cruzi* I; three of *T. cruzi* II and five of rDNA 1/2). The topology of the aCSDI-based dendrograms showed four clusters corresponding, respectively, to *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, rDNA 1/2 + CL Brener and Zymodeme 3 (eight out of nine isolates). This study also revealed that hybrid stocks have a larger proportion of two different-sized homologous chromosomes, as compared with non-hybrid. Overall, our results show that chromosomes are valuable characters for identification of evolutionary groups in *T. cruzi*.

Because rDNA 1/2 isolates have ribosomal cistrons of type 1 and type 2, we have characterized the distribution of both cistrons in the chromosomal bands of these isolates. We verified that the majority of type-2 rDNA genes are localized in a 1.5 Mb band, whereas type-1 cistrons are mostly concentrated in a 1.1 Mb band. We have also estimated the number of chromosomes and genome size of four *T. cruzi* isolates, based on the densitometric analysis of the fluorescence intensity of chromosomes stained with SYBR Green I. For this purpose, we devised a mathematical model that allowed estimating 52, 65, 72 and 44 chromosomes (2N cell), respectively, in CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 and Silvio X10 cl1. The genome size in these isolates has been calculated, respectively, as 70 Mb, 78 Mb, 94,7 Mb and 47 Mb. The novel aspects of *T. cruzi* karyotype here presented contribute to the comprehension of the genome organization of this parasite and will assist the assignment of scaffold to the CL Brener chromosomes.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; molecular karyotype; pulsed-field gel electrophoresis; phenetic analysis; genome size; ribosomal cistrons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Esquema da cadeia epidemiológica da Tripanossomíase Americana.....	3
Figura 1.2.	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 1.3.	Esquema da distribuição de cepas de <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II nos ciclos silvestres e domésticos de transmissão.....	8
Figura 3.1.	Cariótipo Molecular de 22 isolados de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 3.2.	Cariótipo molecular de isolados de <i>T. cruzi</i>	34
Figura 3.3.	Cariótipo Molecular de isolados de <i>T. cruzi</i>	35
Figura 3.4.	Número de pares de homólogos de 9 isolados de <i>T. cruzi</i> que apresentam diferenças de tamanho.....	39
Figura 3.5.	Análise por <i>Southern blotting</i>	40
Figura 3.6.	Análise Fenética.....	43
Figura 3.7.	Dendrogramas construídos com o método UPGMA com os valores de aCSDI de seis sondas que mapeiam nos cromossomos de CL Brener nos intervalos de 600 a 1710 kb (A e B) e 640 a 1060 kb (C).....	47
Figura 3.8.	Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas.	48
Figura 3.9.	Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas.	49
Figura 3.10.	Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas.....	50
Figura 3.11.	Cariótipo Molecular de 19 isolados de <i>T. cruzi</i> incluindo oito isolados de Zimodema 3.....	52-55
Figura 3.12.	Número de pares de homólogos de 19 isolados de <i>T. cruzi</i> que apresentam diferenças de tamanho.....	58
Figura 3.13.	Análise Fenética.....	61
Figura 3.14.	(A) Fragmentos de restrição de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> visualizados em gel de agarose por fluorescência de brometo de etídio; (B) Auto-radiografia do <i>Southern blot</i> hibridado com a sonda TENF 0462.....	62

Figura 3.15.	Dendrograma obtido a partir da matriz de distâncias de dados de RFLP de 5 isolados de <i>T. cruzi</i> digeridos com 8 enzimas de restrição.....	64
Figura 3.16.	<i>Southern blot</i> de DNA cromossômico de isolados de <i>T. cruzi</i> hibridado com seqüências do cistron ribossômico.....	66
Figura 3.17.	Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio para a análise da amplificação dos domínios D7 do isolado SO3 cl5 com os oligonucleotídios D71/D72.....	66
Figura 3.18.	Variação dos valores de fluorescência hipotéticos (F) em função dos tamanhos cromossômicos de CL Brener	69
Figura 3.19.	Relação linear entre valores de fluorescência hipotéticos (F) e os tamanhos cromossômicos de CL Brener	69
Figura 3.20.	Análise densitométrica de cromossomos separados por PFGE.....	71
Figura 3.21.	Variação dos valores de fluorescência em função dos tamanhos cromossômicos de levedura.....	73
Figura 3.22.	Relação linear entre os valores de fluorescência e o tamanho cromossômico de levedura.....	73
Figura 4.1.	Gráfico de correlação obtido pelo teste de Mantel entre as matrizes de distâncias de Jaccard e de aCSDI.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Características dos isolados de <i>T. cruzi</i>	16
Tabela 2.2	Número de acesso no <i>Genbank</i> das ESTs analisadas neste trabalho..	24
Tabela 2.3	Características dos genes analisados neste trabalho.....	24
Tabela 3.1	Análise de similaridade das ESTs utilizadas neste trabalho.....	32
Tabela 3.2	Mapeamento de marcadores genéticos em bandas cromossômicas de nove isolados de <i>T. cruzi</i>	36
Tabela 3.3	Composição de matrizes de distâncias.....	42
Tabela 3.4	Sondas utilizadas para simulações de análise de aCSDI.....	46
Tabela 3.5	Mapeamento de marcadores genéticos em bandas cromossômicas de 19 isolados de <i>T. cruzi</i>	56
Tabela 3.6	Distâncias obtidas com o índice da diferença absoluta de tamanho cromossômico em 19 isolados (aCSDI).....	60
Tabela 3.7	Matriz de caracteres para análise fenética de RFLP.....	63
Tabela 3.8	Matriz de distâncias entre 5 isolados de <i>T. cruzi</i> obtida a partir da matriz de caracteres de fragmentos de restrição de oito enzimas.....	63
Tabela 3.9	Simulação para a análise de dados de fluorescência.....	68
Tabela 3.10	Simulação para a análise de dados de fluorescência – Correção dos dados.....	70
Tabela 3.11	Relação entre os valores de fluorescência (F) obtidos por densitometria e os tamanhos moleculares (kb) dos cromossomos de levedura.....	72
Tabela 3.12	Determinação do número de cromossomos por banda em <i>S. cerevisiae</i>	74
Tabela 3.13	Número e tamanho das bandas cromossômicas e número de cromossomos por banda de isolados de <i>T. cruzi</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
aCSDI	<i>absolute chromosomal size difference index</i> – índice da diferença absoluta de tamanho cromossômico
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> – ferramenta básica de busca de alinhamentos locais
BSA	soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
dATP	desoxiadenosinatrifosfato
dCTP	desoxicitidinatrifosfato
dGTP	desoxiguanosinatrifosfato
DHFR-TS	diidrofolato redutase-timidilato sintase
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	abreviação coletiva para desoxinucleosídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DO	densidade óptica
dTTP	desoxitimidinatrifosfato
D7	região variável D7 do gene de 24S α rRNA
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EF-1α	<i>Elongation factor-1 alpha</i> – fator de elongação 1-alfa
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> – etiqueta de sequência transcrita
E value	<i>Expectation value</i> – valor esperado
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ISO	International Standardization Organization - Organização Internacional de Padronização
LIT	infusão de fígado e triptose
mini-exon	<i>Spliced Leader RNA</i> – <i>SL RNA</i> – sequência líder

MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> – eletroforese de enzimas multilocos
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - EUA)
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i> (eletroforese de campo pulsado)
PSG	solução salina com glicose tamponada com fosfato
PVP	polivinilpirrolidona
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> – amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição)
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rRNA	RNA ribossômico
SDS	lauril sulfato de sódio
SSC	solução salina com citrato de sódio
TAE	solução tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	solução tampão Tris-borato-EDTA
TDR	<i>Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases</i> (Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais)
TE	Tris-EDTA
TR	Tripanotiona redutase
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means</i>
UV	ultravioleta

WHO

World Health Organization – Organização Mundial da
Saúde

X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
cm	centímetro
D	dissimilaridade
<i>g</i>	aceleração da gravidade (aprox. 9,8 m/s ²)
h	hora
kb	quilobase
L	leste
Mb	megabase
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
μCi	microcuries
μg	micromolar
μg/mL	micrograma por mililitro
N	norte
ng	nanograma
nm	nanômetro
nx	número total de bandas no isolado x ;
nxy	número de pares de bandas compartilhadas
ny	número total de bandas no isolado y .
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
S	sul; similaridade
W	oeste
V	volts

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
SUMÁRIO	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	1
1.2 O ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
1.3 Epidemiologia Molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.4 O caráter híbrido em <i>T. cruzi</i>	9
1.5 Projetos Genoma de Parasitas	10
1.6 Cariótipo Molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.7 Objetivos	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Soluções	15
2.2 Meios de cultura	16
2.2.1 Para <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
2.2.2 Para <i>Escherichia coli</i>	16
2.3 Bactérias e células competentes	16
2.3.1 Bactérias	16
2.3.2 Células competentes	17
2.4 Parasitas	17
2.4.1 Cepas e clones de <i>T. cruzi</i>	17
2.4.2 Cultivo de formas epimastigotas	17
2.5 Purificação de ácidos nucléicos	19
2.5.1 Preparação rápida (Minipreparação)	19
2.5.2 Extração de DNA total em larga escala	19

2.5.3	Extração de DNA plasmidial de bactérias	20
2.5.3.1	Transformação de bactérias	20
2.5.3.2	Minipreparação de DNA plasmidial	20
2.6	Análise de fragmentos de restrição por <i>Southern blotting</i>	21
2.6.1	Digestão com enzimas de restrição	21
2.6.2	Eletroforese convencional	22
2.6.3	Transferência de DNA para membranas de náilon	22
2.7	Eletroforese de campo pulsado (PFGE) para determinação do cariótipo molecular	23
2.7.1	Preparação das células	23
2.7.2	Condições de eletroforese de campo pulsado	23
2.7.3	Transferência de DNA cromossômico para membranas de náilon	24
2.7.4	Determinação do tamanho molecular das bandas cromossômicas	24
2.8	Localização cromossômica dos cistrons de RNA ribossômico em isolados híbridos de <i>T. cruzi</i>	25
2.9	Análise do número de cromossomos por densitometria de fluorescência	26
2.10	Sondas utilizadas no trabalho	26
2.10.1	ESTs	26
2.10.2	Genes de <i>T. cruzi</i>	27
2.11	Obtenção de sondas radioativas	28
2.11.1	Por <i>Random primer extension</i>	28
2.11.2	Purificação em coluna de Sephadex	28
2.12	Hibridação de sondas radioativas	29
2.12.1	Reação de Hibridação	29
2.12.2	Lavagem das membranas	29
2.12.3	Reaproveitamento das membranas	29
2.13	PCR	30
2.13.1	Classificação de cepas	30
2.13.2	Amplificação de ESTs	30
2.14	Seqüenciamento	31
2.15	Busca de similaridade em bancos de dados	31

2.16	Análise Numérica	32
2.16.1	Polimorfismo de tamanho cromossômico	32
2.16.2	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição – RFLP	32
2.16.3	Teste de Mantel	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Cariótipo molecular e Análise Fenética de isolados de <i>T. cruzi</i>	34
3.1.1	Cariótipo Molecular	34
3.1.2.	Análise das ESTs	34
3.1.3	Mapeamento de marcadores genéticos em isolados dos grupos <i>T. cruzi</i> I, <i>T. cruzi</i> II e rDNA 1/2	36
3.1.4	Polimorfismo de tamanho cromossômico	42
3.1.5	Análise de Polimorfismo de Fragmento de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP)	44
3.1.6	Análise Fenética com dados de cariótipo molecular e de RFLP	45
3.1.7	Mapeamento de marcadores genéticos em isolados de zimodema 3	55
3.1.8	Polimorfismo de tamanho cromossômico em isolados de quatro grupos de <i>T. cruzi</i>	62
3.1.9	Análise Fenética com dados de cariótipo molecular de quatro grupos de <i>T. cruzi</i>	63
3.1.10	Análise de RFLP com várias enzimas de restrição	65
3.2	Cistron ribossômico	69
3.3	Número de cromossomos e tamanho do genoma de isolados de <i>T. cruzi</i>	71
3.3.1	Simulação de análise de cromossomos corados com SYBER Green I	72
3.3.2	Análise do número de cromossomos de <i>S. cerevisiae</i>	77
3.3.3	Análise do número de cromossomos de <i>T. cruzi</i>	80
4	DISCUSSÃO	83
4.1	Análise Fenética	83
4.2	Cistron ribossômico	95
4.3	Número de cromossomos e tamanho do genoma	96

5	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100
	BIBLIOGRAFIA	114
	ANEXOS	116
ANEXO A -	PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of <i>Trypanosoma cruzi</i> hybrid stocks based on chromosomal size variation	117
ANEXO B -	STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid <i>Trypanosoma cruzi</i> strains	130
ANEXO C -	VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Chromosomal polymorphism, gene syntenry and genome size in <i>T. cruzi</i> I and <i>T. cruzi</i> II groups	139

“Assim, os naturalistas observam uma pulga.
Há pulgas menores que a fazem de presa.
E estas têm pulgas menores ainda para picá-las:
E assim acontece *ad infinitum*.”
Jonathan Swift (1667-1745)

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Trypanosoma cruzi (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum*) é um protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas, que afeta entre 16 e 18 milhões de pessoas em países da América Latina, coloca sob risco de infecção entre 100 e 120 milhões de pessoas (25% da população latino-americana) e causa a morte de 23 000 a 43 000 pessoas por ano. No Brasil, estima-se haver de 2 a 5 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; TDR, 2002).

Na tripanossomíase americana, o parasita circula em um ciclo doméstico e em um ciclo silvestre. No ciclo silvestre, *T. cruzi* interage com insetos triatomíneos e com as seguintes ordens de mamíferos: (i) Didelphimorphia (gambás e cuícas); (ii) Rodentia (marmotas, ratos e cobaias); (iii) Xenarthra (tatus, preguiças e tamanduás); (iv) Chiroptera (morcegos); (v) Carnivora (gatos, cachorros-do-mato, furões e pequenas raposas) (vi) Primates (várias espécies de macacos); e (vii) Lagomorpha (coelhos e lebres) que atuam como reservatórios naturais. No ciclo doméstico, o parasita interage com o homem, gatos, cachorros e vetores domiciliados. Este ciclo estabeleceu-se no passado como consequência da ocupação nômade e da colonização não programada na América Latina, resultando na invasão do ambiente silvestre pelo homem (desmatamento e queimadas) e domiciliação de triatomíneos e mamíferos que trouxeram o parasita em contato com o hospedeiro humano (Figura 1.1). Há ainda vertebrados que são refratários ao *T. cruzi*, mas participam da ecologia da tripanossomíase americana. São principalmente as aves, que se constituem na

principal fonte alimentar da maioria dos triatomíneos, como *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* que vivem em pombais e galinheiros, de onde podem invadir casas próximas e nelas instalar-se. Uma enorme variedade de aves silvestres alberga triatomíneos em seus ninhos, podendo servir de meio de dispersão desses insetos, transportando-os diretamente, ou a seus ovos. Além das aves, alguns lagartos, sapos e rãs também podem servir de fonte alimentar para os triatomíneos, mesmo o parasita não tendo a capacidade de infectá-los (DIAS, 2000).

Os insetos triatomíneos (Classe Hemiptera, Família Reduviidae e Subfamília Triatominae), conhecidos popularmente como “barbeiros”, têm hábitos geralmente noturnos e são estritamente hematófagos. As espécies mais importantes para a doença de Chagas são *Triatoma infestans*, ao sul da linha equatorial, e *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, ao norte desta. Outras espécies também são capazes de colonizar o habitat humano e produzir a doença, como *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma barberi*. Após a localização do hospedeiro, evento mediado pela ação de sensores localizados nas antenas, sensíveis ao calor, à corrente de ar e a agentes químicos, o inseto introduz sua maxila para procurar vasos sangüíneos. O bombeamento do sangue inicia-se na presença de elementos fagoestimulantes, como ATP e 2,3-bisfosfoglicerato. Após a alimentação, o inseto defeca próximo ao local da picada e ao coçar o local irritado, a vítima contamina-se com o parasita (GARCIA; AZAMBUJA, 2000). Além da transmissão natural, via vetor, a doença de Chagas também pode ser transmitida por outras formas de veiculação. Em 1994, estimava-se que 80% dos novos casos seriam produzidos por transmissão vetorial, 17% por transmissão transfusional, 2% por transmissão congênita e 1% por outras vias como: aleitamento, via oral, acidentes de laboratório e transplante de órgãos (SILVEIRA, 2000).

A doença de Chagas, descoberta em 1909 por Carlos Chagas, possui uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e pela infecção generalizada pelo *T. cruzi* em quase todos os órgãos. Na fase crônica, o parasita é escasso na circulação e as reações inflamatórias são menos expressivas. Nesta fase, a doença apresenta três manifestações clínicas principais. A forma indeterminada caracteriza-se pela presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e presença de exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos

normais. No Brasil, dependendo da região analisada, 45 a 72% dos indivíduos soropositivos são assintomáticos. A segunda forma é a cardíaca, caracterizada por danos progressivos ao miocárdio. No Brasil, entre 20 e 40% dos soropositivos desenvolvem esta forma. A terceira forma, representada por 8 a 15% de chagásicos brasileiros, é a forma digestiva resultante da infecção e destruição de células nervosas responsáveis pelo controle das funções viscerais (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

Figura 1.1. Esquema da cadeia epidemiológica da Tripanossomíase Americana – adaptado de Barreto (1979)

A profilaxia da doença de Chagas envolve medidas de controle do vetor, cuidados para evitar a transmissão transfusional e outras ações de caráter inespecífico, relacionadas à melhoria da qualidade de vida da população (SILVEIRA, 2000).

Em 1991 foi lançado um projeto de combate à doença de Chagas, denominado "Iniciativa do Cone Sul", do qual participaram de forma expressiva Brasil, Uruguai, Chile, Argentina, Paraguai e Bolívia. O objetivo do projeto foi

interromper a transmissão da doença a partir da eliminação de vetores domiciliados e controle nos bancos de sangue. Segundo Silveira (2002), a transmissão da doença por *T. infestans*, a única espécie domiciliada presente na quase totalidade das áreas afetadas pela doença no Cone Sul, foi interrompida nestas áreas. No Chile, Uruguai e parte da Argentina e do Brasil já não há risco de veiculação domiciliar da doença por esta espécie. Em muitas áreas admite-se que o vetor possa haver sido eliminado. A transmissão por via transfusional também foi combatida pela triagem de doadores em bancos de sangue. A transmissão congênita vem sendo objeto de atenção em alguns países. O impacto desta via pode ser reduzido com exames no período pré-natal e tratamento específico dos casos de conceitos infectados. O grande desafio que agora se coloca é a sustentabilidade dos resultados atingidos no Cone Sul. Para isso é de fundamental importância que uma vigilância epidemiológica efetiva seja estabelecida para manter o sucesso alcançado e que se implemente o controle do vetor e bancos de sangue em áreas ainda infestadas, sobretudo na Bolívia e no Peru (país que não faz parte do Cone Sul, mas que apresenta áreas altamente infestadas por *T. infestans*) (SILVEIRA, 2000; SILVEIRA et al., 2002). Além disto, outras iniciativas de interrupção da transmissão vetorial estão em andamento em Países Andinos e da América Central, com alguns resultados promissores (WHO, 2002).

Segundo Luquetti e Rassi (2002), o diagnóstico da tripanossomíase americana consiste basicamente em dois grandes conjuntos de métodos: parasitológicos e sorológicos. Os primeiros são indicados quando o parasita pode ser facilmente encontrado no sangue periférico, enquanto que os segundos confirmam a doença na fase crônica. Os métodos parasitológicos podem ser diretos: exame a fresco, micro-hematócrito, concentração de Strout, concentração de Ficoll-Hypaque, lâmina corada e gota espessa; e indiretos: xenodiagnóstico, hemocultura, inoculação em animais e amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os métodos sorológicos envolvem os testes de Hemaglutinação Indireta (HAI), Imunofluorescência Indireta (IFI) e Teste Imunoenzimático de ELISA.

O tratamento da doença de Chagas em bases racionais, mediante estudos clínicos controlados, só começou a ser investigado após uma reunião realizada no Rio de Janeiro em março de 1962, com a participação de pesquisadores brasileiros e de representantes da indústria farmacêutica. Vários ensaios clínicos controlados

foram realizados para testar quimioterápicos no tratamento de pacientes chagásicos (CANÇADO, 2000). Dois fármacos nitroeterocíclicos mostraram-se ativos, e foram lançados no mercado na década de 70. São eles o Nifurtimox (Lampit, Bayer) (1,1-dióxido da tetraidro-3-metil 4 [(5-nitrofurfurilideno) amino]-2H-1,4-tiazina) e o Benzonidazol (Rochagan, Roche) (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida). O mecanismo de ação do Nifurtimox envolve a produção de radicais livres, tais como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio. Estudos sugerem que o mecanismo de ação do Benzonidazol envolva uma diminuição da síntese de proteínas, redução de incorporação dos precursores de RNA e de timidina no DNA (BRENER, 2000). Segundo Cançado (2000), a alta eficácia do benzonidazol na fase aguda e na fase crônica recente representa a grande conquista da terapêutica específica da doença de Chagas e justifica as indicações do tratamento, apesar da baixa porcentagem de cura na fase crônica tardia e de diversas reações colaterais indesejáveis como dermatite, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica.

1.2 O ciclo de vida de *T. cruzi*.

Os aspectos básicos do ciclo biológico do *T. cruzi* são conhecidos há quase um século. Vários aspectos, entretanto, foram elucidados apenas recentemente, enquanto outros são controversos ou não foram estudados ainda.

O ciclo de vida do *T. cruzi* (*Trypanon* (grego) = broca + *sôma* (grego) = corpo; *cruzi*, homenagem a Oswaldo Cruz) inicia-se no hospedeiro vertebrado quando tripomastigotas metacíclicos, eliminados nas fezes e urina do inseto vetor, são inoculados na pele ou mucosas do vertebrado. Os metacíclicos, forma infectante e não proliferativa, podem penetrar potencialmente em qualquer tipo celular ao atingirem a corrente sangüínea do hospedeiro mamífero, exceto neutrófilos, eosinófilos e hemácias. A interiorização do tripomastigota ocorre via formação de um vacúolo parasitóforo. Por um mecanismo pouco conhecido, os tripomastigotas saem do vacúolo parasitóforo e vão para o citoplasma onde se diferenciam em amastigotas. Estes são a forma proliferativa intracelular e se multiplicam por ciclos

de divisão binária. Quando a célula hospedeira contém cerca de 500 amastigotas, inicia-se a diferenciação quase que sincronicamente de amastigotas em tripomastigotas, forma infectante e não proliferativa. Após ruptura celular, os tripomastigotas entram na na circulação, podendo ser ingeridos por um inseto triatomíneo, ou invadir novas células do hospedeiro (de SOUZA, 2000). O ciclo biológico de *T. cruzi*, apresentado na Figura 1.2, foi obtido de publicação do TDR/Wellcome Trust. Apesar de ser pictoricamente uma bela representação, a figura apresenta uma incorreção que é a de sugerir que os amastigotas são liberados na circulação, onde se diferenciam em tripomastigotas.

Figura 1.2. Ciclo biológico de *T. cruzi*. (i) forma infectante; (n) forma não infectante; (+) forma proliferativa; (-) forma não proliferativa. Fonte: TDR/Wellcome Trust (adaptado)

1.3 Epidemiologia Molecular de *Trypanosoma cruzi*

Os isolados de *T. cruzi* apresentam grande diversidade biológica, representada por diferenças na taxa de crescimento, tropismo tissular, antigenicidade, patogenicidade,

infectividade para hospedeiros mamíferos e insetos vetores e suscetibilidade a drogas (ZINGALES et al., 1997a).

Lambrecht (1965 apud DVORAK, 1984)* antecipou a premissa de que o parasita podia ser composto de uma população geneticamente heterogênea, e isto poderia influenciar

no processo infeccioso. A partir da década de setenta, pesquisadores empenharam-se na busca de marcadores moleculares e bioquímicos que poderiam estar correlacionados com algum aspecto particular da doença de Chagas. Desta forma, o protozoário passou a ser caracterizado por várias técnicas moleculares e bioquímicas que visavam a classificação dos isolados ou cepas em grupos e subgrupos, numa abordagem denominada Epidemiologia Molecular (TIBAYRENC, 2003).

O primeiro levantamento sobre a diversidade genética de *T. cruzi*, baseado nos padrões eletroforéticos de seis isoenzimas**, mostrou que as cepas podiam ser reunidas em três grupos principais ou zimodemas (Z1, Z2 e Z3) (MILES et al., 1978). Estudos mais abrangentes de MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) definiram 43 grupos de isoenzimas/alozimas a partir do estudo de 15 locos (TIBAYRENC et al., 1986; TIBAYRENC; AYALA, 1988). Estudos adicionais baseados em dados de MLEE, polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD) e polimorfismo de regiões de genes de RNA ribossômico (rRNA) e da região intergênica de genes de mini-exon (SOUTO; ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996; TIBAYRENC et al., 1993) sugeriram a presença de duas linhagens filogenéticas principais em *T. cruzi*, uma correspondendo a Z1 (isoenzimas de 1 a 25) e a outra a Z2 e Z3 (isoenzimas de 26 a 43) (TIBAYRENC, 1995). Recentemente, um esforço feito por um Comitê de Expertos para unificar as diferentes classificações de *T. cruzi* levou à definição de dois grupos principais, denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (correspondentes, respectivamente, a Z1 e a Z2) (RECOMMENDATIONS..., 1999).

O Comitê recomendou que as posições filogenéticas dos grupos Z3 (MILES et al., 1978), grupo de rDNA 1/2 (SOUTO et al., 1996) e grupo isoenzimático 39 (TIBAYRENC; AYALA, 1988) seriam definidas em estudos posteriores.

*LAMBRECHT, F. L. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 7:346, 1965.

** Segundo Futuyma (1998) o termo correto seria alozima em vez de isoenzima, entretanto na literatura de *T. cruzi* encontra-se apenas *isozyme* no lugar de *allozyme*.

Subseqüentemente, marcadores de RAPD adicionais indicaram que o grupo *T. cruzi* II poderia ser dividido em cinco subgrupos (IIa-IIe) (BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 2000; BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000).

Análises de MLEE, RAPD e de microssatélites (BRISSE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998; TIBAYRENC et al., 1986, TIBAYRENC; AYALA, 1988; TIBAYRENC et al., 1993) sugerem que a estrutura populacional de *T. cruzi* é predominante clonal, com a sexualidade tendo muito pouca ou nenhuma influência na estrutura genética e evolução do parasita (TIBAYRENC et al., 1986; TIBAYRENC; AYALA, 1988).

Entretanto, alguns estudos de MLEE, RAPD, de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) e de análise cladística de dois genes nucleares e de uma região do genoma mitocondrial (BRISSE et al., 1998; HIGO et al., 2000; MACHADO; AYALA, 2001; POVOA et al., 1984; SOUTO et al., 1996) sugeriram que a diversidade genética de *T. cruzi* não é apenas causada por divergência clonal, mas também por trocas genéticas. Souto et al. (1996) descreveram um grupo de isolados, nomeado grupo de rDNA 1/2, que possui dois tipos de cistrons ribossômicos. O seqüenciamento do domínio D7 do gene de rRNA 24S α destes isolados mostrou que seqüências deste domínio de um tipo agrupavam com seqüências de D7 de isolados *T. cruzi* I, ao passo que seqüências D7 de outro tipo, agrupavam com seqüências de isolados de *T. cruzi* II (KAWASHITA et al., 2001). Algumas hipóteses sobre a história evolutiva dos isolados híbridos de grupo de rDNA 1/2 - correspondente ao grupo isoenzimático 39 (TIBAYRENC; AYALA, 1988) e ao subgrupo IId (BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 2000) - foram discutidas anteriormente (SOUTO et al., 1996).

Em 1998, Zingales et al. estudaram 157 isolados obtidos de humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres de doze estados brasileiros. A partir da análise do domínio divergente do gene de rRNA 24S α e da região intergênica do gene de mini-exon, os autores verificaram uma forte associação entre *T. cruzi* II e o ciclo doméstico. Também mostraram que no ciclo silvestre predominam cepas de *T. cruzi* I, embora o grupo *T. cruzi* II também esteja representado. A ligação entre os dois ciclos ocorreria via cepas de *T. cruzi* II que seriam introduzidas no ciclo doméstico por vetores triatomíneos e reservatórios silvestres (Figura 1.3).

Figura 1.3. Esquema da distribuição de cepas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II nos ciclos silvestres e domésticos de transmissão (ZINGALES et al., 1998)

1.4 O caráter híbrido em *T. cruzi*.

As primeiras evidências genotípicas que sugeriram a presença de isolados híbridos em *T. cruzi* foram obtidas a partir da análise da estrutura e seqüência de regiões do cistron ribossômico (SOUTO et al., 1996; KAWASHITA et al., 2001). Souto et al. (1996) descreveram que um grupo de isolados, nomeado grupo de rDNA 1/2, possui dois tipos de cistrons ribossômicos (Ver item 1.3)

Segundo Futuyma (1998), o termo híbrido define um indivíduo originado do cruzamento entre populações geneticamente diferenciadas ou espécies diferentes. Na literatura referente a *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos, o termo híbrido tem sido usado para caracterizar um descendente resultante de trocas genéticas, seja entre linhagens que poderiam ser consideradas de espécies diferentes ou entre organismos de mesma linhagem. Nesse ponto é importante lembrar que uma série de evidências indica que *T. cruzi* é diplóide e que sua reprodução é predominantemente assexuada (TIBAYRENC; AYALA, 1988). Desta forma, os isolados do parasita representam linhagens clonais independentes.

Evidências adicionais para a existência de híbridos em *T. cruzi* foram obtidas por análise filogenética das seqüências nucleotídicas dos genes diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e tripanotona redutase (TR) utilizando Neighbor-Joining e Modelo de Tamura – Nei pelo método da máxima verossimilhança (MACHADO; AYALA, 2001). Os autores concluíram que CL Brener (grupo IIe) e isolados do grupo IId (grupo de rDNA 1/2) são híbridos.

1.5 Projetos Genoma de Parasitas

O projeto genoma de *T. cruzi* foi lançado em 1994 pela Organização Mundial da Saúde, juntamente com os projetos genoma de *Filaria*, *Schistosoma*, *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*. Estes projetos têm como objetivo final aplicado obter novos conhecimentos sobre a biologia dos parasitas visando gerar novas estratégias para o seu combate. Neste sentido, buscam-se genes cujos produtos possam ser utilizados como alvos para novos quimioterápicos e vacinas, ou ainda em métodos mais adequados para seu diagnóstico.

O projeto genoma de *T. cruzi* está sendo desenvolvido por um Consórcio de laboratórios que envolve The Institute for Genomic Research (TIGR), Seattle Biomedical Research Institute (SRBI) e Karolinska Institute (KI), com o apoio financeiro do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health (NIAID/NIH). As estratégias de seqüenciamento, resumo dos dados gerados e outras informações podem ser obtidas em <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1/> e <http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/>.

O organismo escolhido para o projeto foi um clone derivado da cepa CL, denominado clone CL Brener em homenagem a Zigman Brener que o isolou em seu laboratório. Este clone apresenta todas as características importantes de *T. cruzi*: derivou de uma cepa isolada de *Triatoma infestans*; sofre diferenciação em meio líquido; infecta monocamadas de células; em modelos experimentais tem parasitismo preferencial para células de músculo e de coração; apresenta curvas definidas de parasitemia e mortalidade em camundongos e apresenta fase aguda em infecção

humana acidental (ZINGALES, et al., 1997b; ZINGALES et al., 1997c). O cariótipo molecular de CL Brener (*T. cruzi* II) foi definido indicando haver 20 bandas cromossômicas com tamanho entre 3,5 e 0,45 Mb e um tamanho do genoma de 87 Mb (CANO et al., 1995).

No projeto foram construídas bibliotecas de cDNA, cujas seqüências transcritas e expressas na célula, ESTs (*Expressed Sequence Tag* – Etiquetas de seqüências transcritas) são parcialmente seqüenciadas, bibliotecas genômicas em YACS (*Yeast Artificial Chromosome*), BACS (*Bacterium Artificial Chromosome*) e cosmídios e bibliotecas para sequenciamento por *shotgun*. Até setembro de 2004 foram seqüenciados cerca de 760 Mb, o que representa uma cobertura de cerca 19 vezes o tamanho do genoma. Laboratórios integrantes da rede já depositaram no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology) cerca de 14000 ESTs, seqüenciadas principalmente a partir da extremidade 5'. No momento, o seqüenciamento parcial do genoma da cepa Esmeraldo, um organismo não híbrido, está em andamento (N. El-Sayed, comunicação pessoal). Este esforço irá auxiliar na montagem (*assembly*) da informação de seqüência de CL Brener. Também estão sendo atribuídos arcabouços (*scaffolds* = grupos de *contigs* que são fisicamente ligados) às bandas cromossômicas. Prevê-se que os dados de seqüenciamento do genoma de CL Brener sejam liberados até o final de 2004.

Apesar do seqüenciamento do genoma de CL Brener estar próximo a seu término, fica claro que esta informação não irá cobrir a grande diversidade genética deste parasita.

1.6 Cariótipo Molecular de *Trypanosoma cruzi*

A cromatina de *T. cruzi* está organizada em filamentos de nucleossomos, como ocorre em eucariotos pluricelulares. Entretanto, a cromatina apresenta uma reduzida capacidade de condensação, tanto *in vivo*, durante a mitose*, quanto *in vitro*

*Em tripanossomos, leveduras e diatomáceas a mitose ocorre sem a dissolução da carioteca, e é denominada mitose “fechada” em contraposição à mitose “aberta” de eucariotos superiores (ALBERTS et al., 2002).

em diferentes condições iônicas, apesar da similaridade das propriedades bioquímicas entre as histonas do parasita e a dos eucariotos superiores (revisto em SPADILIERO et al., 2002a e b). Desta forma, torna-se impraticável a análise do número e morfologia dos cromossomos, ou seja, do cariótipo (*káryon* = núcleo celular; *týpos* = característica) de *T. cruzi* por métodos convencionais de citogenética.

O desenvolvimento da eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) permitiu a separação de cromossomos intactos de protozoários parasitas. O DNA dos cromossomos migra no gel e originam-se bandas que podem ser visualizadas sob a luz ultravioleta a 260 nm após coloração com brometo de etídio, ou após digitalização do gel corado com SYBR Green I em equipamento apropriado. A separação das bandas cromossômicas e sua hibridação com sondas específicas têm sido utilizadas para estimar o número e os tamanhos dos cromossomos de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*, definindo assim o seu cariótipo molecular. Desta forma, os dados obtidos permitiram concluir que o cariótipo molecular das cepas de *T. cruzi* é estável durante o cultivo em laboratório e que o genoma do parasita apresenta grande plasticidade, com elevado polimorfismo no número e tamanho de cromossomos dos isolados (GIBSON, MILES, 1986; ENGMAN et al., 1987; HENRIKSSON; PETTERSON; SOLARI, 1993; HENRIKSSON, et al., 1995; HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996; CANO et al., 1995). Além disso, foi verificada certa correlação entre o cariótipo molecular dos isolados e sua classificação nos zimodemas 1 e 2 (HENRIKSSON et al., 1995). Também se concluiu que a maior parte dos cromossomos de *T. cruzi* existe em pares, que são considerados cromossomos homólogos. Estes podem variar em tamanho, característica atribuída principalmente a expansões e contrações de repetições de seqüências seriadas (*in tandem*) (HENRIKSSON; ASLUND E PETTERSON; 1996). Além disto, eventos menos freqüentes de fusões e quebras de cromossomos podem ocorrer, como foi claramente demonstrado para os genomas de leishmanias do Velho e Novo Mundo (BRITTO et al., 1998).

A análise da variação do tamanho de cromossomos foi utilizada para medir as distâncias entre espécies de *Leishmania* (DUJARDIN et al., 1995; 1998), tendo-se como premissa que quanto maior for a diferença de tamanho entre cromossomos homólogos de dois isolados, mais divergentes serão estes estoques. Mais

recentemente, um estudo análogo foi realizado para os isolados de *T. cruzi*, mostrando a presença de dois grupos principais – correspondentes a *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (HENRIKSSON et al., 2002); ou três grupos - *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e um terceiro grupo onde os isolados híbridos (rDNA 1/2) estão incluídos (PEDROSO; CUPOLILLO; ZINGALES, 2003; e esta tese).

O cariótipo molecular do clone CL Brener foi definido, indicando haver 20 bandas cromossômicas, nas condições de PFGE utilizadas, que variam de 0,45 a 3,5 Mb (CANO et al., 1995; HENRIKSSON et al., 1995; HENRIKSSON; ASLUND E PETTERSON; 1996). Apesar de haver boa concordância entre os dados obtidos pelos dois laboratórios, observam-se discrepâncias em relação ao número e tamanho de alguns cromossomos. De fato, Cano et al. (1995) sugerem que CL Brener teria 64 cromossomos, ao passo que Henriksson et al. (1995) estimam um número de 80.

A informação obtida a partir da análise do cariótipo molecular dos isolados contribuirá para o entendimento da organização e plasticidade do genoma de *T. cruzi* e para estabelecer relações evolucionárias entre as cepas.

1.7 Objetivos

O objetivo geral do estudo foi caracterizar o cariótipo molecular de representantes das duas linhagens principais de *Trypanosoma cruzi*, de cepas de zimodema 3 e de híbridos putativos e averiguar o significado evolutivo do polimorfismo cromossômico. Além disto, o mapeamento de marcadores genéticos nas bandas cromossômicas irá auxiliar a atribuição de arcabouços (*scaffolds*) às bandas de CL Brener.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Determinar o cariótipo molecular dos isolados após separação das bandas cromossômicas por eletroforese em campo pulsado (PFGE);
- Mapear marcadores genéticos nas bandas cromossômicas;
- Aplicar Análise Fenética aos dados de cariótipo molecular e de RFLP;
- Localizar os cistrons ribossômicos nos cromossomos de isolados híbridos do grupo de rDNA 1/2;
- Determinar o número de cromossomos de CL Brener e de outros isolados e estimar o tamanho de seu genoma.

“As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível; as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária.”
Lewins e Lewontin

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Soluções

PBS: tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2; NaCl 150 mM.

PSG: tampão fosfato de sódio 60 mM, pH 8,0; NaCl 42 mM; glicose 5,4%.

RF1: RbCl 100 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM; KAc 30 mM, pH 7,5; Glicerol 15 % (p/v).

RF2: MOPS 0,5 M pH 6,8; RbCl 10 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mM; Glicerol 15 % (p/v).

SSC 1x: NaCl 150 mM; Citrato de sódio 15 mM, pH 7,0.

SOLUÇÃO I: Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0.

SOLUÇÃO II: SDS 1% (p/v); NaOH 0,2M.

SOLUÇÃO III: Acetato de potássio 3 M, Ácido acético 2 M, pH 4,8.

STE: Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM.

TAE 1x: Tris-acetato 4 mM; EDTA 1 mM.

TBE 1x: Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM, pH 8,3.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM.

TELT: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 62,5 mM; LiCl 2,5 M; Triton X100 4% (p/v).

TEN: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 10 mM.

TFB: KCl 100 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 45 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, HACoCl_3 3 mM; K-MES 10 mM pH 6,3.

X-Gal: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-Galactopiranosídeo 2% (p/v) em dimetil sulfóxido.

2.2 Meios de cultura

2.2.1 Para *Trypanosoma cruzi*

LIT: Para cultivo de formas epimastigotas utilizou-se o meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) preparado segundo Castellani; Ribeiro e Ferreira (1967), contendo 10% de soro fetal bovino.

2.2.2 Para *Escherichia coli*

TY: Bacto-triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,4.

LB: Bacto-triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,4

LB Ágar: LB com 15 g/L de ágar bacteriológico*.

SOB: Bacto-triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; pH 7,4.

SOC: SOB; glicose 20 mM; MgSO₄ 10 mM.

2.3 Bactérias e células competentes

2.3.1 Bactérias

Escherichia coli DH5 α *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

*Para meio sólido adicionou-se, dependendo da seleção, ampicilina a 100 μ g/ml de acordo com Sambrook; Fritsch e Maniats, (1989).

2.3.2 Células competentes

Uma colônia de *E. coli* DH5 α cultivada em meio LB foi inoculada em 10 mL de SOB e mantida a 37 °C durante a noite sob agitação (250 rpm). Em 50 mL de meio SOB, contendo MgSO₄ 10mM, foi diluído 0,5 mL da cultura de crescimento. A cultura foi inoculada sob agitação a 37 °C por 2-4 h, até atingir densidade aproximada de 5x10⁷ células/mL (DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,5). As células foram centrifugadas a 1000 g por 15 min a 4 °C e ressuspensas em 1/3 do volume inicial da cultura, em solução TFB. Após 10-15 min em gelo as células foram centrifugadas a 1000 g por 15 min a 4 °C e ressuspensas em 1/3 do volume inicial da cultura, em solução RF1. Em seguida as células foram centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a 4 °C e ressuspensas em 1/12,5 do volume inicial da cultura, em solução RF2. Os estoques foram conservados a -70 °C.

2.4 Parasitas

2.4.1 Cepas e clones de *T. cruzi*

Neste trabalho foram analisados 22 isolados de *T. cruzi*, originários de diversas regiões e de diferentes hospedeiros (Tabela 2.1).

2.4.2 Cultivo de formas epimastigotas

Formas epimastigotas foram cultivadas em meio de cultura LIT contendo 10% de soro fetal bovino, e mantidas a 28 °C sem agitação. As culturas foram repicadas uma a duas vezes por semana quando atingiam a fase estacionária. Para estimar a

densidade de células, a cultura foi diluída com PBS e os parasitas foram contados em câmara de Neubauer.

Tabela 2.1 - Características dos isolados de *T. cruzi*

Isolados ^(a)	Hospedeiro	Origem	Grupos de <i>T. cruzi</i> ^(b)	Sub-grupos de <i>T. cruzi</i>				
				DTU ^(c)	Clonet ^(d)	rDNA	Mini-exon	Híbridos Putativos
CL Brener	<i>T. infestans</i>	Brasil	II	IIe	43	1 ^(e)	1 ^(e)	+ ^(h)
Esmeraldo	Humano	Brasil	II	IIb	30	1 ^(e)	1 ^(e)	-
Y	Humano	Brasil	II	ND	ND	1 ^(e)	1 ^(e)	ND
NR cl3	Humano	Chile	NA	IIId	39	1/2 ^(e)	1 ^(e)	+ ^{(e) (h)}
SO3 cl5	<i>T. infestans</i>	Bolívia	NA	IIId	39	1/2 ^(e)	1 ^(e)	+ ^{(e) (h)}
SC43 cl1	<i>T. infestans</i>	Bolívia	NA	IIId	39	2 ^(e)	1 ^(e)	+ ^{(e) (h)}
Dm 28c	<i>D. marsupialis</i>	Venezuela	I	ND	ND	2 ^(e)	2 ^(e)	ND
Silvio x10	Humano	Brasil	I	I	17	2 ^(e)	2 ^(e)	-
cl1								
YuYu	<i>T. infestans</i>	Brasil	I	ND	ND	2 ^(e)	2 ^(e)	ND
115	Humano	Brasil	NA	ND	ND	1/2 ^(e)	1 ^(e)	+ ^(e)
B147	Humano	Brasil	NA	ND	ND	1/2 ^(e)	1 ^(e)	+ ^(e)
3663	<i>P. geniculatus</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3A ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4166	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4167	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4176	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3A ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4181	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4182	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3A ^(f)	Z3 ^(g)	ND
4183	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
JJ	Humano	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
Rb III	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
Rb VIII	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND
Rb X	<i>R. brethesi</i>	Brasil	NA	ND	ND	Z3B ^(f)	Z3 ^(g)	ND

NA = Não se aplica. ND = não determinado.

(a) Todos os isolados exceto Y, YuYu e isolados do Zimodema 3 são clones. Os isolados B147 e 115 foram gentilmente doados pelo Dr. Egler Chiari (UFMG). Os isolados do grupo Zimodema 3 foram gentilmente doados pelo Dr. Octávio Fernandes (FIOCRUZ – RJ).

(b) Recommendations from a Satellite Meeting (1999).

(c) De acordo com Brisse; Barnabé e Tibayrenc (2000).

(d) De acordo com Tibayrenc e Ayala (1988).

(e) De acordo com Souto et al. (1996).

(f) De acordo com Mendonça et al. (2002).

(g) De acordo com Fernandes et al. (2001).

(h) De acordo com Machado e Ayala (2001).

2.5 Purificação de ácidos nucleicos

2.5.1 Preparação rápida (Minipreparação)

O DNA purificado pelo método de extração rápida de DNA de tripanossomatídios foi descrito por Medina-Acosta e Cross (1993).

Um total de 2×10^8 células foi lavado com PBS em um campo centrífugo de 5900 g por 5 min. Ao sedimento acrescentaram-se 150 μ L de TELT e o lisado obtido foi homogeneizado por inversão à temperatura ambiente por 5 min. Os ácidos nucleicos foram extraídos pela adição Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1) e agitação por vórtice. A fase aquosa obtida por centrifugação (16 000 g por 10 min) foi precipitada pela adição de 300 μ L de etanol absoluto (gelado). Os ácidos nucleicos recuperados por centrifugação (16 000 g por 10 min), foram lavados com etanol absoluto (gelado) e dissolvidos em 50 μ L de TE. Todas as centrifugações foram feitas à temperatura ambiente. Para a hidrólise de RNA residual incubou-se a preparação com RNase A (livre de DNase), concentração final de 20 μ g/mL, por uma hora a 37 °C.

2.5.2 Extração de DNA total em larga escala

Para a extração de DNA em larga escala, foi realizado o procedimento descrito por Gruber e Zingales (1993). Os parasitas foram lavados três vezes com PBS a 4 °C em um campo centrífugo de 5900 g por 10 min. O sedimento celular obtido (10^9 células) foi estocado a -70 °C, até sua utilização. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (NaCl 0,1 M; EDTA 0,25 mM; proteinase K 100 μ g/mL; lauril sarcosinato de sódio 0,5% (p/v); RNase A (livre de DNase) 10 μ g/mL), e incubadas a 50 °C por 30 min, com agitação a cada 5 min por 5 s. A

extração foi feita com volume igual de fenol, agitação leve por uma hora à temperatura ambiente e centrifugação por 5 min a 1500 g. A fase aquosa foi retirada e extraída por mais duas vezes com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugação (1500 g por 30 s). A fase aquosa foi dialisada com 1 L de tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM) durante a noite, com agitação constante a 4 °C. Foi acrescentada RNase A (livre de DNases) para a concentração final de 100 µg/mL, seguida de incubação a 37 °C por 3 h. O DNA foi purificado por uma extração com igual volume de fenol e dialisado com TE a 4 °C durante a noite. A concentração de DNA foi estimada por espectrofotometria determinando-se as absorbâncias a 260 nm e 280 nm.

2.5.3 Extração de DNA plasmidial de bactérias

2.5.3.1 Transformação de bactérias

Os plasmídios foram amplificados por transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5α segundo Sambrook; Fritsch e Maniatis, (1989). As bactérias contendo os plasmídios foram plaqueadas em placas de Petri contendo LB ágar em presença de 40 µL de X-Gal. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

2.5.3.2 Minipreparação de DNA plasmidial

A extração de DNA foi feita pelo método de lise alcalina (adaptado de Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). Por esse método as bactérias foram inoculadas a 37 °C em 3mL de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina sob agitação durante a

noite. As células foram precipitadas por 1 min e ressuspensas por vórtice em 100 µl de Solução I (gelada) contendo 1 µg/µl de RNase (livre de DNase). As misturas seguintes foram suavemente homogeneizadas por inversão. Foram adicionados 200 µl de Solução II (para lise) e após 5 min, 200 µl de Solução III (para neutralização) gelada. Após 30 min no gelo, os componentes celulares foram sedimentados por 15 min, e uma parcela do sobrenadante (400 µl) foi adicionada a 300 µl de isopropanol. A mistura foi centrifugada por 10 min e o DNA lavado consecutivamente com etanol 100% e 70%. Após a evaporação completa de etanol, o DNA foi dissolvido em água ou TE e analisado em gel de agarose 1%. Todas as centrifugações ocorreram com um campo centrífugo de 16 000 g.

2.6 Análise de fragmentos de restrição por *Southern blotting*

2.6.1 Digestão com enzimas de restrição

O DNA genômico (em média 2,4 µg) de isolados de *T. cruzi* foi digerido com uma ou mais enzimas de restrição (Biolabs). As condições de reação seguiram as recomendações do fabricante, e ocorreram a 37 °C por aproximadamente 14 horas. Na reação foi acrescentada espermidina para uma concentração final de 1 mM. Segundo Bouché (1981), a espermidina melhora a eficiência da digestão, possivelmente porque, sendo uma poliamina, tem a capacidade de ligar-se ao DNA e deslocar moléculas que poderiam inibir a digestão. As reações foram interrompidas por desnaturação das enzimas a 67 °C.

2.6.2 Eletroforese convencional

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se TBE 1X acrescido de brometo de etídio em uma concentração final de 0,5 µg/mL. A eletroforese ocorreu em um campo elétrico ≤ 5 V/cm por cerca de 3 horas em um gel de 15 cm x 15 cm. Como marcador de tamanho molecular foi usado DNA de fago λ cl857 digerido com *EcoRI* e *Hind III*.

2.6.3 Transferência de DNA para membranas de náilon

Após a corrida eletroforética o gel foi lavado sob agitação por 10 min em solução de HCl 0,2 M, tratado com solução NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M por 30 min, e submetido à neutralização com a solução Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2; NaCl 1,5 M e EDTA 1 mM por 60 min. O DNA foi transferido a vácuo para uma membrana Hybond N (Amersham), no sistema Vacum Blotter Trans-Vac TE 80 (Hoefer Scientific Instruments), usando a membrana seladora Vacum Seal (Pharmacia), e a bomba Red-Evac (Hoefer Scientific Instruments). Após a transferência em SSC 20X a uma pressão negativa de 50 mm de Hg por 1 h, a membrana foi lavada com solução SSC 2X por alguns minutos e deixada secar durante a noite à temperatura ambiente. O DNA foi fixado na membrana por exposição à luz UV por 5 min e aquecimento a 80 °C por 2 h. As membranas foram hibridadas e lavadas de acordo com os itens **2.10 a 2.12**.

2.7 Eletroforese de campo pulsado (PFGE) para determinação do cariótipo molecular

2.7.1 Preparação das células

Formas epimastigotas foram lavadas duas vezes com PSG e ressuspensas neste tampão para uma densidade de 10^9 células/mL. Aliquotas de 100 μ L foram misturadas com igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (2% em PSG) e aspiradas com seringa para o interior de microcapilar de vidro (capacidade 100 μ L; diâmetro aproximado de 1,3 mm; SIGMA). Os microcapilares foram colocados por alguns minutos sobre uma superfície plana de gelo coberta com filme de PVC. Após solidificação, os cilindros de agarose foram retirados dos microcapilares e colocados em tubos cônicos contendo 7 mL de uma solução de EDTA 0,5 M, pH 8,0; SDS 1% e proteinase K 1 mg/mL, por 12 a 16 horas a 56 °C. Os cilindros foram mantidos em uma solução de EDTA 0,25 M; pH 8,0 a 4 °C.

2.7.2 Condições de eletroforese de campo pulsado

Para separação das bandas cromossômicas por eletroforese de campo pulsado foi utilizado o sistema Gene Navigator (Pharmacia). A eletroforese foi feita em gel 1,1 % de agarose (Rapid Agarose, Gibco/BRL) em tampão TBE 0,5 X pH 8,5 a 80 V à temperatura de aproximadamente 13 °C*, nas condições descritas anteriormente (CANO et al., 1995). Foram utilizadas cinco fases de pulsos homogêneos (N/S, E/W) com interpolação por 132 h: fase 1, pulso de 90 s para um tempo de corrida de 30 h; fase 2, pulso de 200 s, para um tempo de 30 h; fase 3, pulsos de 350 s, para um

*Segundo o manual do aparelho Gene Navigator System, para o tampão de corrida alcançar uma temperatura típica de 12 °C a 15 °C, o aparelho deverá ser ajustado de 8 °C a 10 °C.

tempo de 24 h; fase 4, pulsos de 500 s, para um tempo de 24 h; fase 5, pulsos de 800 s para um tempo de 24 h. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com uma solução 1,0 µg/mL de brometo de etídio, por 10 min, depois lavado por 1 h com água destilada para retirar o excesso de corante e fotografado. Como marcador de tamanho molecular foram utilizados cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 (Biolabs).

2.7.3 Transferência de DNA cromossômico para membranas de náilon

Após eletroforese, o DNA foi despurinado (10 min em HCl 0,2 M), lavado com água destilada por duas vezes e desnaturado com uma solução de NaOH 0,4 M e NaCl 1 M duas vezes por 20 min. O DNA foi transferido a vácuo para uma membrana Zeta-Probe (Bio Rad) com o sistema Vacum Blotter Trans-Vac TE 80 (Hoefer Scientific Instruments), usando a membrana seladora Vacum Seal (Pharmacia), e a bomba Red-Evac (Hoefer Scientific Instruments). Após a transferência em NaOH 0,4 M e NaCl 1 M a uma pressão negativa de 50 mm de Hg por 1 h, a membrana foi neutralizada por 5 min em solução de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 e NaCl 1M. O DNA foi fixado na membrana por exposição à luz UV durante 5 min e por aquecimento a 80 °C por 30 min. As membranas foram hibridadas e lavadas de acordo com os itens **2.10 a 2.12**.

2.7.4 Determinação do tamanho das bandas cromossômicas

O tamanho molecular das bandas cromossômicas foi estimado a partir de uma curva de calibração que relaciona o logaritmo do tamanho molecular dos cromossomos de *S. cerevisiae* em função de sua mobilidade eletroforética. A porção central e mais densa de cada banda no gel, ou nos auto-radiogramas, foi considerada

para efeito de cálculo. Neste trabalho foram produzidos treze *blots* de cromossomos. Para avaliar a reprodutibilidade das determinações, o mesmo *blot* foi hibridado com diferentes sondas após verificar, por auto-radiografia, a remoção da sonda precedente. Além disso, a mesma sonda foi hibridada com *blots* diferentes. O tamanho atribuído a cada banda apresenta um limiar de significância de 75 kb.

2.8 Localização cromossômica dos cistrons de RNA ribossômico em isolados híbridos de *T. cruzi*

Epimastigotas dos isolados CL Brener, NR cl3, SO3 cl5 e Dm28c foram preparadas e submetidas à eletroforese de campo pulsado para o fracionamento de seus cromossomos, conforme descrito acima. O gel foi corado com brometo de etídio e o DNA foi transferido para membrana de náilon do tipo Zeta Probe. A membrana foi cortada em tiras para posterior hibridação com as seguintes seqüências de RNA ribossômico: i) 24S α rDNA – (clone G101p10, ARRUDA et al., 1990); ii) domínio D7 do grupo 1 (seqüência de 125 pb); iii) domínio D7 do grupo (seqüência de 110pb). Condições de hibridação e lavagem estão descritas adiante (ver itens **2.11 e 2.12**).

Para obter uma melhor resolução do DNA cromossômico de SO3 cl5 compreendido entre 1,6 e 1,1 Mb, foram empregadas as seguintes condições de PFGE: pulsos de 350 s; tempo de 90 h; diferença de potencial de 84 V; temperatura de 13 °C. O gel foi corado com brometo de etídio e frações de agarose (75 x 5 x 1,5 mm) foram cortadas e lavadas várias vezes com TE. Fragmentos (10 x 5 x 1,5 mm) foram cortados de cada fração retirada do gel. Em seguida foram diluídos com 5 volumes de TE, aquecidos a 100 °C por 5 min e resfriados em gelo. Uma alíquota de 15 μ L de cada diluição foi submetida a PCR com os oligonucleotídios D71/D72 nas condições descritas por Souto e Zingales (1993) (ver item **2.13**). Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida e corados com brometo de etídio.

2.9 Análise do número de cromossomos por densitometria de fluorescência

A avaliação do número de cromossomos separados por PFGE foi feita por densitometria de fluorescência do DNA corado com SYBR Green I (Molecular Probes). O gel de PFGE foi corado à temperatura ambiente por 1 h com SYBR Green I (diluído 10 000 vezes em TBE 0,5 X pH 8,0). Em seguida o gel foi digitalizado em PhosphorImager Storm 840 (Molecular Dynamics) usando a opção para quimiofluorescência. A análise densitométrica foi feita usando o aplicativo ImageQuant (Molecular Dynamics). Como marcador de tamanho molecular foram utilizados cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 (Biolabs).

2.10 Sondas utilizadas no trabalho

2.10.1 ESTs

Neste estudo foram mapeadas dezoito ESTs de CL Brener, obtidas a partir de bibliotecas normalizadas de cDNA da forma epimastigota e gentilmente cedidas pelo Dr. Wim Degraeve e Dr. Adeilton Brandão da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Tabela 2.2). As ESTs estão clonadas no fagomídio pT7T318D (Pharmacia) e flanqueadas pelos promotores de T3 e T7 (URMENYI et al., 1999).

Tabela 2.2 – Número de acesso no *Genbank* das ESTs analisadas neste trabalho

TENF	Número de Acesso
0330	AA556080
0335	AA556083
0368	AA556093
0448	AA556122
0449	AA556123
0462	AA532107
0479	AA556136
0549	AA676030
0552	AA676033
0580	AA676059
0582	AA676060
0593	AA676068
0613	AA676083
0629	AA676097
0638	AA676103
0654	AA676109
0686	AA676135
0712	AA676152

2.10.2 Genes de *T. cruzi*

Foram mapeadas seqüências derivadas de nove genes de *T. cruzi* previamente caracterizados (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Características dos genes analisados neste trabalho

Gene	Número de Acesso	Características
DHFR-TS	L22484	Diidrofolato redutase – timidilato sintase. Gene de cópia única (RECHE et al., 1994)
GAPDH	P22513	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. (KENDALL et al., 1990)
TcMSH2	AY005798	MutS classe 2 de <i>T. cruzi</i> . Gene de cópia única (AUGUSTO-PINTO et al., 2001)
TR	M38051 Z13958	Tripanotiona redutase. Gene de cópia única (SULLIVAN et al., 1991)
rRNA 24S α	L14468	RNA ribossômico 24S α (cepa Y) (SOUTO, ZINGALES, 1993)
rRNA 5S	M59502	RNA ribossômico 5S (HERNANDEZ-RIVAS et al., 1992)
RNA helicase	AF067953	RNA-helicase da família das DEAD-box (CL Brener) (DIAZ ANEL et al., 2000)
Actina 2	U20234	Não publicado
eEF1 α	L76077	Fator de elongação – 1 (subunidade α) (BILLAUT-MULOT et al., 1996).

2.11 Obtenção de sondas radioativas

2.11.1 Por *Random primer extension*

A incorporação de nucleotídios radioativos no DNA foi realizada com o kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen). Amostras de 200 ng de DNA foram diluídas em água e desnaturadas em banho fervente por 5 min. O tubo foi transferido imediatamente para o gelo. Foram adicionados dTTP, dGTP e dCTP para uma concentração final de 20 μ M cada um, 40 μ Ci de [α - 32 P] dATP, 3 U de fragmento Klenow, e um tampão de mistura de iniciadores aleatórios constituído por (concentrações finais) HEPES 201 mM, Tris-HCl 51 mM, MgCl₂ 5,1 mM, 2-mercaptoetanol 9,9 mM, BSA 0,399 mg/mL e oligodesoxirribonucleotídios (hexâmeros) 270 μ g/mL em pH 6,8. A reação ocorreu à temperatura ambiente por 2 a 3 horas e foi interrompida pela adição de EDTA a uma concentração final de 25 mM.

2.11.2 Purificação em coluna de Sephadex

O DNA marcado foi purificado de nucleotídios não incorporados por cromatografia de filtração em gel Sephadex-G50 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para avaliar a eficiência da incorporação, uma alíquota de sonda foi analisada em contador de cintilação líquida (Liquid Scintillation Analyzer TR 1600, Packard).

2.12 Hibridação de sondas radioativas

2.12.1 Reação de Hibridação

A reação de hibridação nas membranas ocorreu em 10 mL de SSC 3X, SDS 5% (p/v), Ficoll 1% (p/v), PVP 0,1% (p/v) e DNA de esperma de salmão 100 µg/mL a 60 °C (forno Hybaid). A solução de hibridação foi usada na etapa de pré-hibridação das membranas durante 90 min a 60 °C. A sonda, previamente fervida por 5 min e incubada em gelo por 3 min, foi adicionada a esta solução e mantida por 12 a 16 h durante o processo de hibridação.

2.12.2 Lavagem das membranas

Após a remoção da sonda, a membrana foi lavada seqüencialmente em SSC 3X/SDS 0,1%; SSC 1X/SDS 0,1%, e em alguns casos, SSC 0,1X /SDS 0,1%. Para membranas Zeta Probe, todas as lavagens foram realizadas por 30 min a 60 °C em soluções pré-aquecidas. Para membranas Hybond-N, as primeiras duas lavagens foram de 60 min cada. A membrana foi exposta ao filme de raios X a -70 °C em presença de tela intensificadora, por tempos variáveis, ou em Phosphor Screen (Molecular Dynamic) que foi digitalizado em PhosphorImager Storm 840 para análise por ImageQuant Molecular Dynamic Program.

2.12.3 Reaproveitamento das membranas

Para eliminação da sonda e reaproveitamento das membranas, na maioria das vezes foi feita uma lavagem de 1 h em solução SSC 0,1X e SDS 0,5% (p/v) a 100

°C. A remoção da sonda foi confirmada por exposição da membrana a filmes de raios X ou em Phosphor Screen. Quando necessário, o processo foi repetido.

2.13 PCR

2.13.1 Classificação de cepas

A classificação dos isolados nos subgrupos de *T. cruzi* foi baseada no tamanho dos produtos de amplificação do domínio D7 do gene de rRNA 24S α . A reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos D71 e D72 nas condições descritas por Souto e Zingales (1993). Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida 6,5 % e corados com brometo de etídio.

2.13.2 Amplificação de ESTs

As ESTs foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores T3 e T7. Dez nanogramas de DNA plasmidial foram amplificados na presença de 0,5 μ M de cada iniciador, 0,1 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP), tampão *Taq* (KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9,0), MgCl₂ 1mM, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) em um volume final de 50 μ L. As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 4 min e submetidas a 30 ciclos de amplificação: 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para associação e 1 min a 72 °C para extensão dos iniciadores no termociclador Mini Cycler (MJ Research). Os produtos de amplificação foram precipitados com Etanol e Acetato de amônio de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em TBE 1X, usando-se como marcador de tamanho molecular DNA λ cl857

digerido com *EcoRI/HindIII* ou DNA 100 pares de bases *ladder* (Pharmacia). A eletroforese ocorreu sob um campo elétrico constante (≤ 5 V/cm) em TBE 1x com 0,5 µg/ml de brometo de etídio no gel e no tampão. O gel foi fotografado sobre luz UV (MacroVue transilluminator, Pharmacia).

2.14 Seqüenciamento

O seqüenciamento das ESTs foi feito pelo método de terminação de cadeia de Sanger (SANGER et al., 1977) modificado para uso de polimerase termoestável e com reações de amplificação terminadas com ddNTPs marcados com substâncias fluorescentes. As reações foram realizadas com o kit Big Dye Terminator v1.0 (Perkin-Elmer) e 0,32 µM de cada iniciador (T3 ou T7). A reação de amplificação linear ocorreu em termociclador Minicycler (MJ Research) nas seguintes condições: a) 96 °C/30 s; b) 34 ciclos de 96 °C/10 s; 50 °C/5 s; e 60 °C/4 min. Após precipitação com isopropanol, as amostras foram ressuspensas em um tampão apropriado para análise em seqüenciador automático (ABI Prism 377 DNA Sequencer, ou no seqüenciador de capilar 3700 ABI). As seqüências obtidas e os respectivos cromatogramas foram analisados com o aplicativo Chromas (Technelysium Pty Ltd).

2.15 Busca de similaridade em bancos de dados

O formato FASTA (Pearson & Lipman, 1988) das seqüências geradas foi utilizado para busca de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast>). As buscas de similaridades foram feitas com o programa BLASTN nos bancos de dados de seqüências nucleotídicas nr e

dbEST, e com BLASTX, no banco de dados nr. Para as seqüências geradas em nosso laboratório foram utilizados valores confiáveis de $E \leq 10^{-10}$.

2.16 Análise Numérica

2.16.1 Polimorfismo de tamanho cromossômico

A matriz de distâncias com os dados de cariótipo molecular foi obtida a partir do índice de diferença absoluta de tamanho cromossômico – aCSDI definido por Dujardin et al. (1995). Este índice é calculado pela equação:

$$\text{aCSDI}(ab) = \sum_i (|L_{ai} - L_{bi}| + |S_{ai} - S_{bi}|) \quad (1)$$

onde L e S são, respectivamente, o tamanho do maior e do menor cromossomo reconhecido pela sonda i nos isolados a e b . A aglomeração dos índices obtidos para a construção dos dendrogramas foi realizada usando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*) disponível em diferentes aplicativos (NEIGHBOR do PHYLIP package software (FELSENSTEIN, 1993); MEGA versão 2.1 (KUMAR et al., 1993) e NTSYS-PC, (ROLPH, 1989)).

2.16.2 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição – RFLP

Os padrões de RFLP foram analisados assumindo os caracteres como códigos binários, considerando a presença ou ausência de bandas. A matriz binária foi transformada em uma matriz de similaridade de coeficientes de Jaccard (JACCARD,

1908 apud Dujardin et al., 1995)* para cada par de isolados de *T. cruzi*, usando-se o aplicativo FreeTree

(PAVLICEK; HRDA; FLEGR, 1998). A matriz de dissimilaridade foi obtida para cada par de isolados pela relação:

$$D = 1 - S = 1 - 2n_{xy}/(n_x + n_y) \quad (2)$$

sendo: D = dissimilaridade; S = similaridade; n_{xy} = número de pares de bandas compartilhadas; n_x = número total de bandas no isolado x; n_y = número total de bandas no isolado y.

O algoritmo UPGMA foi usado para construir os dendrogramas. O teste de *bootstrap* foi realizado para os dados de RFLP usando 1000 réplicas com o aplicativo FreeTree (PAVLICEK; HRDA; FLEGR, 1998). Este é um teste de confiança que consiste de uma simples reamostragem com reposição pseudoaleatória dos dados, em que cada reamostragem gera uma árvore réplica e ao final do processo a árvore final pode ser estimada.

2.16.3 Teste de Mantel

Para avaliar se há correlação entre as duas matrizes de distâncias obtidas com os dados de polimorfismo de tamanho cromossômico e de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição foi utilizada a rotina MXCOMP do NTSYS-PC (ROHLF, 1989) usando-se 10 000 permutações aleatórias. Os valores de **p** e de **r** do teste de Mantel foram estimados.

A estatística de Mantel visa estabelecer a significância da correspondência entre duas matrizes quadradas e simétricas obtidas independentemente para um mesmo conjunto de observações, neste caso, as matrizes para os dados de polimorfismo de tamanho cromossômico e de RFLP. As correlações foram consideradas significantes quando os valores de **p** foram menores que 0,05.

*Jaccard, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles** v. 44, p 223-270, 1908.

“O Universo não é apenas mais complexo do que pensamos, é
mais complexo do que nós podemos pensar.”
John B. S. Haldane

3 RESULTADOS

3.1 Cariótipo molecular e Análise Fenética de isolados de *T. cruzi*

3.1.1 Cariótipo Molecular

Os cromossomos de 22 isolados de *T. cruzi* foram separados por eletroforese de campo pulsado (PFGE) nas condições padronizadas por Cano et al. (1995). A Figura 3.1 mostra o padrão de bandas cromossômicas, obtido após coloração com brometo de etídio, de isolados dos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, rDNA 1/2 e Zimodema 3. Os padrões indicam que as bandas cromossômicas de isolados dos grupos *T. cruzi* II, rDNA 1/2 e Zimodema 3 têm tamanho molecular maior (até 3,5 Mb) em relação a isolados de *T. cruzi* I (até 2,8 Mb). Dezoito géis de PFGE foram produzidos e o DNA cromossômico dos isolados foi transferido para membranas de náilon para a análise do cariótipo molecular por hibridação com sondas de DNA.

3.1.2. Análise das ESTs

A partir de uma coleção de ESTs de epimastigotas de CL Brener, escolheram-se aleatoriamente dezoito clones. Estas ESTs já tinham sua sequência depositada em bancos de dados. No entanto, para maior confiabilidade dos dados, as ESTs foram re-sequenciadas com os iniciadores dos promotores T3 ou T7 que flanqueiam o inserto.

A análise de similaridade usando o aplicativo BLASTN e BLASTX no banco de dados dbEST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) confirmou a identidade de todas as ESTs, exceto a TENF0549. Na Tabela 3.1 indicamos a denominação da EST, seu tamanho em pb, a similaridade com os dois programas e seu respectivo *E-value*. O conjunto dos dados da análise de similaridade usando o aplicativo BLASTX indica para as 18 ESTs que 6/18 (33,3%) das seqüências não apresenta similaridade em bancos de dados (Tabela 3.1).

Figura 3.1. Cariótipo Molecular de 22 isolados de *T. cruzi* (descritos na Tabela 1.1). O DNA cromossômico foi separado por PFGE, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz U.V. a 260 nm. Na coluna central indicam-se isolados de *T. cruzi* II (em vermelho); grupo de rDNA 1/2 (em laranja); *T. cruzi* I (em roxo); Z3 (em verde). Ao lado do gel, o tamanho molecular em Mb

3.1.3 Mapeamento de marcadores genéticos em isolados dos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e rDNA 1/2

Nota: Parte dos resultados descritos a seguir consta do artigo: PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p.79-90, 2003. (Anexo A).

Inicialmente analisamos o cariótipo molecular de nove isolados: três classificados como *T. cruzi* I, três como *T. cruzi* II e três como grupo de rDNA 1/2 (Tabela 1.1). Para esta finalidade, 18 ESTs e seqüências gênicas clonadas a partir de vários isolados (Tabela 2.3) foram marcadas com [α -P³²] dATP por *random primer extension* e hibridadas com o DNA cromossômico dos isolados separados por PFGE e transferido para membranas de náilon.

Tabela 3.1 – Análise de similaridade das ESTs utilizadas neste trabalho

EST	pb	BLASTN	E- value	BLASTX	E-value
0330	1196	TENF0330	2e-029	Proteína hipotética conservada [<i>Bordetella parapertussis</i>]	4e-021
0335	778	TENF0335	0	Caseína Quinase 1 (homolog 2) [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	2e-060
0368	618	TENF0368	0	Proteína ribossômica S12 – [<i>Trypanosoma brucei</i>]	9e-038
0448	895	TENF0448	e-114	Sem similaridade	-----
0449	802	TENF0449	0	Sem similaridade	-----
0462	1394	TENF0462	e-174	Sem similaridade	-----
0479	619	TENF0479	e-10	Adenilato ciclase [<i>T. cruzi</i>]	e-10
0549	350	TENQ0826*	3e-10	Transcriptase reversa putativa [<i>Cicer arietinum</i>]	2e-12
0552	626	TENF0552	e-161	Fator de transcrição BTF3a – [<i>Homo sapiens</i>]	3e-10
0580	790	TENF0580	e-144	Possível hidrolase [<i>Leishmania major</i>]	1e-016
0582	964	TENF0582	1e-77	Similaridade insignificante	-----
0593	773	TENF0593	0	Sem similaridade	-----
0613	1214	TENF0613	3e-059	Proteína ribossômica L7a [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	2e-048
0629	680	TENF0629	e-169	Proteína Quinase relacionada ao ciclo celular [<i>Homo sapiens</i>]	1e-17
0638	508	TENF0638	0	Proteína Quinase T11854 [<i>Trypanosoma brucei</i>]	1e-015
0654	897	TENF0654	0	Subunidade ATPásica 5 do proteassomo [<i>Trypanosoma brucei</i>]	6e-084
0686	782	TENF0686	5e-83	Similaridade insignificante	-----
0712	897	TENF0712	e-128	Proteína Quinase (CBL-interacting) 23 [<i>Oryza sativa</i>]	2e-38

*A comparação por BLAST2X entre a seqüência de TENF0549 depositada no banco e a submetida confirma a sua identidade (e-133).

A Figura 3.2 apresenta o padrão de hibridação de 13 ESTs com os isolados. A Figura 3.3 mostra o padrão de hibridação de 8 sondas representando genes de *T. cruzi* previamente clonados: dois genes de RNA ribossômico (5S e 24S α); e seis genes que codificam proteínas (actina 2; fator de elongação 1, RNA helicase, Dihidrofolato redutase – timidilato sintase (DHFR-TS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e Tripanotiona redutase (TR)). Dados da literatura indicam que os genes de rRNA 5S e 24S α estão representados em um número elevado de cópias, cerca de 800 e 100 cópias, respectivamente, por genoma haplóide do parasita. Por outro lado, os genes de RNA helicase, TR, DHFR-TS e fator de elongação 1 estariam representados em apenas uma cópia por genoma haplóide. A abundância para os genes de actina 2 foi reportada por Cevallos et al. (2003). O gene está distribuído em três cópias no genoma de CL Brener, sendo duas seqüências seriadas (*in tandem*) em um cromossomo, e a outra no cromossomo homólogo. Não há dados sobre a abundância do gene GAPDH (Tabela 2.3). A análise do padrão de hibridação das sondas ilustra o polimorfismo cromossômico dos isolados.

Na Tabela 3.2 estão resumidos os tamanhos cromossômicos determinados para a hibridação de 25 sondas em 9 isolados de *T. cruzi*. Não especificamos a denominação numérica das bandas cromossômicas devido a discrepâncias entre os tamanhos reportados para CL Brener por Cano et al. (1995) e Henriksson; Aslund e Pettersson (1996), e também por esta denominação não ter sido determinada para os demais isolados. Dados da seqüência de DNA repetitivo correspondendo à TEF0629 não foram incluídos.

Figura 3.2. Cariótipo Molecular de isolados de *T. cruzi* (descritos na Tabela 1.1). DNA das bandas cromossômicas foi transferido para membranas Zeta Probe e hibridado com ESTs marcadas com [α - 32 P] - dATP (a denominação da EST é indicada abaixo de cada figura) (Painéis A e B). No painel B mostra-se o padrão de três ESTs que hibridam com mais de duas bandas no mesmo isolado

Figura 3.3. Cariótipo Molecular de isolados de *T. cruzi* (descritos na Tabela 1.1). As membranas Zeta Probe obtidas por transferência de *Southern* foram hibridadas com seqüências gênicas marcadas com [α - 32 P] - dATP (indicados abaixo em cada membrana)

Tabela 3.2 – Mapeamento de marcadores genéticos em bandas cromossômicas de nove isolados de *T. cruzi* (valores em kb). Em *itálico* mostra-se a diferença de tamanho entre cromossomos homólogos putativos

Marcador	CL Br.	Esmeraldo	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu
EST 330	955	1282	964	1335	1347	1145	1435	1600	1866
	790	865	964	938	938	981	1176	1600	671
	<i>Δ</i>	<i>165</i>	<i>417</i>	<i>0</i>	<i>397</i>	<i>409</i>	<i>163</i>	<i>259</i>	<i>0</i>
EST 335	1952	1689	2015	2382	2382	2425	1832	1735	1488
	1952	1475	1720	1970	1987	1997	1832	1735	1311
	<i>Δ</i>	<i>0</i>	<i>214</i>	<i>295</i>	<i>412</i>	<i>394</i>	<i>429</i>	<i>0</i>	<i>177</i>
EST 368	3375	3342	3326	3310	3310	3278	2549	2120	2624
	3375	3342	2919	3063	3063	3063	2549	2120	2204
	<i>Δ</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>407</i>	<i>247</i>	<i>247</i>	<i>215</i>	<i>0</i>	<i>420</i>
EST 448	1394	1632	1303	768	726	726	554	518	620
	649	1632	1303	663	620	649	554	518	495
	<i>Δ</i>	<i>746</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>105</i>	<i>106</i>	<i>77</i>	<i>0</i>	<i>125</i>
EST 449	1001	1136	1026	1175	1119	1130	1313	1359	1385
	1001	1136	1026	1175	1119	1130	1313	1359	1385
	<i>Δ</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 462	1067	1093	1106	1162	1162	1162	1312	1361	1447
	991	1093	991	1162	1162	1162	1312	1361	1312
	<i>Δ</i>	<i>75</i>	<i>0</i>	<i>115</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>135</i>
EST 479	3015	1680	1618	3034	3034	2996	1340	1290	1558
	2813	1307	1454	3034	3034	2996	1197	1290	1372
	1323		1212	1598	1618	1520			1266
	1204		1212	1340	1340	1323			1181
EST 549	1429	1429	1429	1414	1429	1475	1414	1429	1429
	1429	1429	1429	1414	1429	1475	1414	1429	1429
	<i>Δ</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 552	2164	1842	1831	2972	2972	2972	1585	1488	1421
	1709	1540	1831	2127	2127	2228	1252	1488	1421
	<i>Δ</i>	<i>456</i>	<i>301</i>	<i>0</i>	<i>845</i>	<i>845</i>	<i>744</i>	<i>334</i>	<i>0</i>
EST 580	1058	604	626	1071	1058	1098	650	699	658
	666	604	626	690	690	725	650	699	658
	<i>Δ</i>	<i>392</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>381</i>	<i>368</i>	<i>373</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 582	1110	742	615	1182	1197	1259	563	592	611
	607	671	615	1004	1016	1069	490	592	565
	<i>Δ</i>	<i>503</i>	<i>71</i>	<i>0</i>	<i>178</i>	<i>180</i>	<i>190</i>	<i>73</i>	<i>0</i>
EST 593	1041	1122	1296	1709	1709	1709	1372	1471	1558
	855	1000	1115	1168	1168	1202	591	1017	1372
			1029	1029	1029	1041		664	960
			846	807	807	846			634

continua

conclusão									
Marcador	CL Br.	Esmeraldo	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu
EST 613	681	681	666	719	731	759	681	584	501
	681	681	666	719	731	759	681	584	501
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST 638	1639	1723	1598	1649	1670	1628	1789	1779	1779
	1454	1568	1291	1649	1670	1628	1789	1594	1594
	646	4593	4593	752	742	771	627	556	675
EST 654	703	703	695	703	703	720	612	649	558
	703	703	641	703	703	720	612	649	571
	0	0	54	0	0	0	0	0	571
EST 686	636	665	641	671	674	715	624	619	570
	636	665	641	671	674	715	624	619	570
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST 712	724	782	670	717	670	683	571	602	516
	724	782	670	717	670	683	571	602	516
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RNA helicase	829	1167	1045	2020	2020	2020	1225	1435	1334
	829	983	604	1703	1724	1766	1125	1152	1084
	0	183	442	317	296	254	100	283	250
rDNA 24S α	1350	1771	1842	1500	1500	1638	1900	1575	1525
	1350	1475	1136	1100	1100	1078	1600	1382	
							1200		
Actina 2	2349	1494	1269	767	797	777	578	575	690
	685	1494	1269	668	685	685	578	575	548
	1664	0	0	99	112	92	0	0	143
EF1- α	1769	1962	2031	1209	1209	1266	994	875	789
	1181	846	1670	1209	1209	1266	994	875	720
	587	1117	362	0	0	0	0	0	70
rDNA 5S	1730	1781	1697	1714	1665	1681	1359	1440	1511
	1511	1781	1697	1109	1056	1130	1359	1440	1359
	219	0	0	605	608	551	0	0	153
GAPDH	1235	1496	1360	2029	2051	2175	1019	997	1030
	1235	1496	1360	1729	1776	1729	971	997	1030
	0	0	0	300	275	446	48	0	0
TR	3000	2933	3028	2933	2933	3000	2553	2282	2664
	3000	2933	2751	2933	2933	3000	2553	2282	2369
	0	0	277	0	0	0	0	0	295
DHFR-TS	1110	1171	1171	1202	1235	1242	1411	1419	1613
	1030	1171	1171	1058	1235	1242	1411	1419	1473
	80	0	0	144	0	0	0	0	140

3.1.4 Polimorfismo de tamanho cromossômico

A análise geral do padrão de hibridação de 26 sondas (ver Tabela 3.2 e Figuras 3.2 e 3.3) indica um elevado polimorfismo cromossômico entre os isolados. Observamos que: (i) apenas a EST 549 (1/26; 3,8%) hibrida com uma única banda de tamanhos muito similares em todos os isolados; (ii) a EST 629 (1/26; 3,8%) corresponde a uma sequência altamente repetitiva, distribuída em muitas bandas cromossômicas em todos os isolados; (iii) o padrão de hibridação de todas as sondas com os três isolados do grupo de rDNA 1/2 é muito conservado; (iv) neste grupo de isolados, três ESTs 479, 593, 638 – e rDNA 24S α (4/26; 15,4%) hibridam com mais do que duas bandas (Figuras 3.2 e 3.3); (v) Treze sondas: ESTs 368; 448; 552; 582; 613; 654; 686; 712; e sequências correspondentes aos genes de rRNA 5S; Actina 2, TR, GAPDH e EF1- α (13/26; 50%) hibridam em cromossomos maiores nos isolados de *T. cruzi* II e grupo 1/2 quando comparados a *T. cruzi* I; (vi) quatro sondas: ESTs: 330; 449; 462; e a sequência de DHFR (4/26; 15,4%) apresentam a situação inversa.

Três ESTs (479; 593; 638, Figura 3.2C) e o gene de rRNA 24S α (Figura 3.3) hibridaram com mais do que duas bandas em isolados híbridos putativos e não híbridos. Este padrão poderia ser resultante de: (i) aneuploidia; (ii) presença de pseudogenes; (iii) hibridação com um elemento transponível; (iv) presença de cópias gênicas em cromossomos heterólogos; (v) heterogeneidade da população do parasita. Para investigar essas possibilidades, uma busca por similaridades em bancos de dados com o programa BLASTX indicou que a EST 479 mostra alta similaridade com adenilato ciclase de *T. cruzi*. Esta enzima é codificada por uma família multigênica distribuída em seis cromossomos de CL Brener (TAYLOR et al., 1999). A EST 593 mostra alta similaridade com a glicoproteína GP63-2 de *T. cruzi*, também codificada por vários genes (GRANDGENETT et al., 2000). Neste caso, os autores não determinaram a distribuição dos genes nas bandas cromossômicas. A EST 638 não foi caracterizada em *T. cruzi*. Finalmente, a presença de um pseudogene do gene de rRNA 24S α foi reportada na cepa Y de *T. cruzi* (ARRUDA et al., 1990).

Algumas sondas hibridaram com duas bandas (Figura 3.2 e Figura 3.3), as quais têm sido interpretadas como duas variantes de tamanho de um par de

cromossomos homólogos (HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSON, 1996). O número de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes hibridando com 21 sondas foi determinado, assim como a sua variação em tamanho (Tabela 3.2 e Figura 3.4). A maior variação no número e tamanho de cromossomos homólogos foi observada em isolados híbridos do grupo de rDNA 1/2: NR cl3 (12/21; 57%), SO3 cl5 (11/21; 52%), SC43 cl1 (11/21; 52%) e em CL Brener (11/21; 52% das sondas) seguido pela cepa YuYu (10/21; 48%). Nos isolados não híbridos, a porcentagem de homólogos de tamanhos diferentes foi mais baixa (5-28% das sondas).

Figura 3.4. Número de pares de homólogos de 9 isolados de *T. cruzi* que apresentam diferenças de tamanho (ordenada). No painel do lado esquerdo mostra-se a divisão das diferenças de tamanho em 5 classes

3.1.5 Análise de Polimorfismo de Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP)

Tendo por objetivo investigar a organização dos marcadores genéticos no genoma, o DNA dos isolados foi digerido com *Pst* I e, após eletroforese em gel de agarose, foi transferido para membranas de náilon. As membranas foram hibridadas com dezoito sondas previamente analisadas no cariótipo molecular. O padrão obtido para seis dessas sondas está mostrado na Figura 3.5. Foi observado que os tamanhos dos fragmentos de restrição com os quais hibridaram quatro sondas (ESTs 462; 552; 613; e RNA helicase (4/18; 22,2%) são característicos de cada um dos três grupos: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e híbridos putativos (grupo de rDNA 1/2 e CL Brener) (Figura 3.5). É interessante notar que o mesmo padrão de hibridação obtido para cada uma das oito sondas: ESTs 448; 449; 462; 552; 580; 613; 686; e RNA helicase (8/18; 44,4%) é observado em CL Brener e três cepas do grupo de rDNA 1/2. Nestes casos, dois ou três fragmentos de restrição foram identificados sugerindo heterozigosidade desses isolados pelo menos para alguns locos (como exemplos ver os padrões das ESTs 448; 462; 552; 686; e RNA helicase na Figura 3.5). Entretanto, apenas duas sondas (EST 462 e RNA helicase) (2/18; 11%) mostraram para os isolados heterozigotos putativos um perfil intermediário entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Figura 3.5).

Figura 3.5. Análise por *Southern blotting*. O DNA genômico foi digerido com *Pst* I e analisado em eletroforese de agarose 0,8%. Após a transferência para membranas de náilon, as amostras foram hibridadas com as sondas indicadas. Marcadores de tamanho molecular em kb

3.1.6 Análise Fenética com dados de cariótipo molecular e de RFLP

A análise da variação do tamanho de cromossomos homólogos foi utilizada originalmente para medir as distâncias entre espécies de *Leishmania* (DUJARDIN et al., 1995; 1998). Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, um estudo análogo foi publicado para medir distâncias entre isolados de *T. cruzi* (HENRIKSSON et al., 2002). Em nosso estudo, as diferenças de tamanho dos cromossomos hibridados com dezoito sondas foram usadas para realizar a análise fenética de nove isolados dos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e rDNA 1/2, sob o modelo progressivo (aCSDI). Uma vez que, o algoritmo aCSDI é baseado no exame de

cromossomos homólogos sob uma hipótese diplóide, as hibridações das ESTs 479; 593; 629; 638; e rDNA 24S α não foram incluídas na análise. A matriz de distâncias (em kb) foi obtida aplicando o índice aCSDI para cada par de isolados (Tabela 3.3, dados na matriz triangular superior). Esta matriz foi transformada em um dendrograma pelo algoritmo UPGMA (Figura 3.6A). Três grupos de isolados foram reconhecidos (veja abaixo).

Os padrões de RFLP foram analisados assumindo os caracteres como códigos binários, considerando a presença ou ausência de bandas. A matriz binária foi transformada em uma matriz de similaridade de coeficientes de Jaccard (JACCARD, 1908 apud Dujardin et al., 1995) para cada par de isolados de *T. cruzi*, usando-se o aplicativo FreeTree (Figura 3.6B). Neste caso também, três grupos de isolados foram identificados. A topologia do dendrograma de RFLP foi suportada por altos valores de bootstrap (Figura 3.6B).

A análise de correlação entre distâncias fenéticas calculadas de dados de cromossomos e de RFLP foi realizada usando-se o teste de Mantel.

Tabela 3.3 - Composição de matrizes de distâncias. Matriz triangular superior: distâncias obtidas com o índice da diferença absoluta de tamanho cromossômico (aCSDI). Matriz triangular inferior (em itálico): distâncias de Jaccard obtidas com os dados de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP)

Isolado	CL	Esmeraldo	Y	NR	SO3	Sc43	Dm28c	Silvio	YuYu
	Br								
CL Br		8692	8030	8738	8897	9314	12734	14268	14883
Esmeraldo	<i>0,442</i>		5335	11949	12203	12850	11209	12671	12460
Y	<i>0,434</i>	<i>0,150</i>		11198	11166	11469	10650	12498	13113
NR	<i>0,231</i>	<i>0,373</i>	<i>0,333</i>		590	1436	10390	12043	12977
SO3	<i>0,231</i>	<i>0,404</i>	<i>0,365</i>	<i>0,042</i>		1226	10473	12065	13000
Sc43	<i>0,231</i>	<i>0,404</i>	<i>0,365</i>	<i>0,042</i>	<i>0,000</i>		11318	12893	13931
Dm28c	<i>0,500</i>	<i>0,500</i>	<i>0,520</i>	<i>0,491</i>	<i>0,518</i>	<i>0,518</i>		3476	4708
Silvio	<i>0,569</i>	<i>0,520</i>	<i>0,538</i>	<i>0,534</i>	<i>0,534</i>	<i>0,534</i>	<i>0,318</i>		4326
YuYu	<i>0,518</i>	<i>0,520</i>	<i>0,538</i>	<i>0,509</i>	<i>0,509</i>	<i>0,509</i>	<i>0,279</i>	<i>0,233</i>

C- Distâncias Médias

aCSDI	Grupo A	Grupo B	Grupo C	RFLP	Grupo D	Grupo E	Grupo C
Grupo A	6441			Grupo D	0,128		
Grupo B	10865	1084		Grupo E	0,390	0,170	
Grupo C	12720	12121	4170	Grupo C	0,524	0,518	0,227

Figura 3.6 Análise Fenética. Dendrogramas obtidos pelo algoritmo UPGMA com dados de cariótipo molecular (**A**) e de RFLP (**B**) a partir de dezoito sondas. (**C**) Distâncias médias intergrupo (matriz triangular inferior) e intragrupos (diagonal principal) obtidos de distâncias aCSDI e de Jaccard. Grupos A, B e C estão definidos em **A**; grupos C, D e E definidos em **B**. Os valores de *bootstrap* (1000 replicatas) estão indicados em **B**. As distâncias são indicadas abaixo dos dendrogramas e na Tabela. Isolados do grupo *T. cruzi* II (em vermelho); rDNA 1/2 (em verde); *T. cruzi* I em azul

Os dendrogramas de aCSDI e RFLP revelaram a presença de três grupos que mostram alta similaridade no nível de grupo (exceção para CL Brener), mas não dentro dos grupos (Figura 3.6 A e B). Os grupos A e E incluíram isolados classificados como *T. cruzi* II, e o grupo C, reuniu os três isolados do grupo *T. cruzi* I. O grupo B incluiu os isolados do grupo de rDNA 1/2 (dendrograma de aCSDI na Figura 3.6 A) e o grupo D reuniu isolados do grupo B e CL Brener (Figura 3.6 B). Portanto, o grupo D representa putativos genótipos heterozigotos (veja Tabela 1.1).

Para investigar a robustez dos grupos definidos pelos marcadores de aCSDI e RFLP, as distâncias médias inter e intragrupo foram determinadas com o aplicativo MEGA 2.1 (Figura 3.6 C). Os dados indicam que o grupo B (grupo de rDNA 1/2) foi muito homogêneo, apresentando a mais baixa distância intragrupo (1084 kb). Por outro lado, o grupo A (*T. cruzi* II + CL Brener) foi o mais heterogêneo com a maior distância média intragrupo (6441 kb). O grupo C (*T. cruzi* I) apresentou um valor intermediário (4170 kb). Os valores das distâncias médias entre os grupos não foram significativamente diferentes, corroborando a existência de três grupos. As mesmas conclusões foram obtidas das distâncias médias calculadas com os dados de RFLP. Neste caso também, o grupo D, o qual reunia os isolados híbridos putativos (CL Brener e grupo de rDNA 1/2), teve a mais baixa distância média intragrupo (0,128) e apresentou uma dissimilaridade de 0,39 com o grupo E (*T. cruzi* II) e 0,524 com o grupo C (*T. cruzi* I).

A identificação de três grupos pelas análises de RFLP e de aCSDI está em desacordo com os dendrogramas reportados previamente por Henriksson et al. (2002) obtidos de dados de cariótipo, MLEE e RFLP, nos quais apenas dois grupos principais de *T. cruzi* são evidenciados. Deve ser apontado que cinco dos nove isolados aqui investigados (CL Brener, Silvio X10 cl1; Esmeraldo cl3; NR cl3; e SC43 cl1) estavam incluídos na amostra analisada por aqueles autores.

A análise de aCSDI de Henriksson et al. (2002) empregou seis sondas localizadas nos cromossomos de CL Brener que variavam de 590 a 1710 kb. Para investigar se a fonte de discrepância entre os dendrogramas estava relacionada ao número de sondas e/ou aos tamanhos dos cromossomos hibridados, nós compilamos dados de aCSDI

selecionando entre as sondas aquelas que hibridaram com bandas cromossômicas de CL Brener de 600 a 1710 kb. Doze sondas encontraram este requisito (ver Tabela 3.4). Dois dendrogramas foram construídos com seis sondas cada, escolhidas de acordo com a ordem ascendente de numeração (Tabela 3.4) (Figura 3.7 A e B). Um dendrograma adicional foi determinado com seis sondas que mapeiam em cromossomos de 640-1060 kb (Figura 3.7 C). Simulações adicionais foram feitas com número variável de sondas (3-21 sondas) (ver Tabela 3.4 e Figuras 3.8, 3.9 e 3.10). Em todos os casos, três principais grupos foram identificados correspondendo àqueles mostrados na Figura 3.6 A. Alta congruência foi encontrada nos grupos dentro das taxa, excetuando que a posição de CL Brener apresentou alternância entre os grupos *T. cruzi* II e de rDNA 1/2. Por outro lado, diferenças topológicas entre os grupos e dentro dos principais grupos foram observadas (Figuras 3.8 a 3.10).

Tabela 3.4 - Sondas utilizadas para simulações de análise de aCSDI. Em *itálico*, a diferença de tamanho entre putativos cromossomos homólogos (valores em kb)

Sonda	CL Brener	Esmeraldo	Y	NR	SO3	SC43	Dm28C	Silvio	YuYu
EST 330	955	1282	964	1335	1347	1145	1435	1600	1866
	790	865	964	938	938	981	1176	1600	671
Δ	<i>165</i>	<i>417</i>	<i>0</i>	<i>397</i>	<i>409</i>	<i>163</i>	<i>259</i>	<i>0</i>	<i>1194</i>
EST 448	1394	1632	1303	768	726	726	554	518	620
	649	1632	1303	663	620	649	554	518	495
Δ	<i>746</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>105</i>	<i>106</i>	<i>77</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>125</i>
EST 449	1001	1136	1026	1175	1119	1130	1313	1359	1385
	1001	1136	1026	1175	1119	1130	1313	1359	1385
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 462	1067	1093	1106	1162	1162	1162	1312	1361	1447
	991	1093	991	1162	1162	1162	1312	1361	1312
Δ	<i>75</i>	<i>0</i>	<i>115</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>135</i>
EST 549	1429	1429	1429	1414	1429	1475	1414	1429	1429
	1429	1429	1429	1414	1429	1475	1414	1429	1429
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 580	1058	604	626	1071	1058	1098	650	699	658
	666	604	626	690	690	725	650	699	658
Δ	<i>392</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>381</i>	<i>368</i>	<i>373</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 582	1110	742	615	1182	1197	1259	563	592	611
	607	671	615	1004	1016	1069	490	592	565
Δ	<i>503</i>	<i>71</i>	<i>0</i>	<i>178</i>	<i>180</i>	<i>190</i>	<i>73</i>	<i>0</i>	<i>46</i>
EST 613	681	681	666	719	731	759	681	584	501
	681	681	666	719	731	759	681	584	501
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 654	703	703	695	703	703	720	612	649	571
	703	703	641	703	703	720	612	649	571
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>54</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 686	636	665	641	671	674	715	624	619	570
	636	665	641	671	674	715	624	619	570
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
EST 712	724	782	670	717	670	683	571	602	516
	724	782	670	717	670	683	571	602	516
Δ	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
rDNA 5S	1730	1781	1697	1714	1665	1681	1359	1440	1511
	1511	1781	1697	1109	1056	1130	1359	1440	1359
Δ	<i>219</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>605</i>	<i>608</i>	<i>551</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>153</i>

A – Sondas: ESTs 330; 448; 449; 462; 549; 580 (600 – 1710 kb)

B – Sondas: ESTs 582; 613; 654; 686; 712; 5S rDNA (600 – 1710 kb)

C – Sondas: ESTs 330; 580; 613; 654; 686; 712 (500 – 1060 kb)

Figura 3.7. Dendrogramas construídos com o método UPGMA com os valores de aCSDI de seis sondas que mapeiam nos cromossomos de CL Brener nos intervalos de 600 a 1710 kb (A e B) e 640 a 1060 kb (C). As sondas estão especificadas em cada dendrograma. As escalas indicam a distância aCSDI em kb

Figura 3.8. Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas. **A** – uma sonda (330); **B** – três sondas (330, 335 e 368); **C** – seis sondas (330, 335, 368, 448, 449 e 462)

Figura 3.9. Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas. **A** – nove sondas (EST: 330, 335, 368, 448, 449, 462, 549, 552 e 580); **B** –doze sondas (sondas do item **A** mais as EST: 582, 613 e 654); **C** – quinze sondas (sondas do item **B** mais EST 686, EST 712 e Actina 2)

Figura 3.10. Dendrogramas construídos com números variáveis de sondas. **A** – Dezoito sondas; **B** - 21 sondas: item **A** mais as sondas DHFR, TR e GAPDH

3.1.7 Mapeamento de marcadores genéticos em isolados de zimodema 3

NOTA: Os resultados apresentados a seguir ainda não foram publicados.

Conforme especificado na Introdução, na Reunião Satélite realizada em 1999, um Comitê de Expertos determinou que *T. cruzi* seria dividido em dois grupos principais (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) e que a posição filogenética de possíveis híbridos e de isolados pertencentes ao Zimodema 3 deveria ser definida a partir de estudos posteriores. As análises fenéticas feitas até aqui incluíram três isolados de *T. cruzi* I (Dm28c, Sílvia e YuYu), três isolados de *T. cruzi* II (CL Brener, Esmeraldo e Y), e três do grupo de rDNA 1/2 (NR cl3, SO3 cl5 e SC43 cl). A pergunta que nos fizemos foi: como isolados de Zimodema 3 (Z3) se relacionam com os grupos supracitados?

Para responder esta pergunta escolhemos 11 isolados de Zimodema 3 (Tabela 1.1), cujas bandas cromossômicas foram separadas por PFGE. Decidimos analisar também dois isolados de humanos de Minas Gerais (B147 e 115) que foram tipados como pertencentes ao grupo de rDNA 1/2 (Tabela 1.1). Dada a limitação de espaço no gel, não pudemos dispor todos os isolados na mesma membrana juntamente com amostras de representantes dos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e rDNA 1/2, analisados anteriormente. Desta forma, fizemos quatro arranjos de isolados dos quatro grupos (ver Figura 3.1). Após transferência do DNA cromossômico para membranas de náilon, determinamos o padrão de hibridação de nove sondas. Obtivemos um total de 36 padrões de hibridação, alguns deles mostrados na Figura 3.11. Na Tabela 3.5 estão resumidos os tamanhos cromossômicos determinados para a hibridação de 9 sondas em 19 isolados de *T. cruzi*, dentre os quais, 8 isolados de Zimodema 3 e os dois isolados de grupo 1/2, B147 e 115.

Figura 3.11. Cariótipo Molecular de 19 isolados de *T. cruzi* incluindo oito isolados de Zimodema 3 (descritos na Tabela 1.1). DNA das bandas cromossômicas foi transferido para membranas Zeta Probe e hibridado com seqüências gênicas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - dATP (a denominação da seqüência é indicada abaixo de cada figura)

Figura 3.11. (continuação) Cariótipo Molecular de 19 isolados de *T. cruzi* incluindo oito isolados de Zimodema 3 (descritos na Tabela 1.1). DNA das bandas cromossômicas foi transferido para membranas Zeta Probe e hibridado com seqüências gênicas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP (a denominação da seqüência é indicada abaixo de cada figura)

Figura 3.11. (continuação) Cariótipo Molecular de 19 isolados de *T. cruzi* incluindo oito isolados de Zimodema 3 (descritos na Tabela 1.1). DNA das bandas cromossômicas foi transferido para membranas Zeta Probe e hibridado com seqüências gênicas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - dATP (a denominação da seqüência é indicada abaixo de cada figura)

Figura 3.11. (continuação) Cariótipo Molecular de 19 isolados de *T. cruzi* incluindo oito isolados de Zimodema 3 (descritos na Tabela 1.1). DNA das bandas cromossômicas foi transferido para membranas Zeta Probe e hibridado com seqüências gênicas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - dATP (a denominação da seqüência é indicada abaixo de cada figura)

Tabela 3.5 - Mapeamento de marcadores genéticos em bandas cromossômicas de 19 isolados de *T. cruzi* (valores em kb). Em itálico mostra-se a diferença de tamanho entre cromossomos homólogos putativos

Grupo	<i>T. cruzi</i> II			rDNA 1/2			<i>T. cruzi</i> I			Zimodema 3								rDNA 1/2	
Marcador	CL Br	Esm	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu	JJ	Rb3	Rb8	Rb10	4166	4167	4176	3663	B147	115
EST 330	1048	1460	964	1514	1512	1145	1435	1677	1866	2201	2651	2744	2457	2374	2677	2500	1049	952	1021
	840	889	964	959	988	981	1176	1677	671	646	2201	2407	2294	1695	2291	2343	994	952	1021
Δ	208	570	0	555	524	163	259	0	1194	1555	450	336	163	679	386	157	55	0	0
EST 335	2739	2079	2381	2570	2569	2641	2159	2102	1877	2782	2782	2782	2762	2843	2832	2763	2750	2577	2826
	2358	1849	2095	2289	2259	2352	2159	2102	1641	2782	2782	2782	2762	2451	2527	2763	2428	2376	2064
Δ	381	230	286	281	310	289	0	0	236	0	0	0	0	392	305	0	322	201	762
EST 368	3164	3138	3326	3310	3310	3278	2549	2174	2624	2457	2526	272	2782	2338	2337	2760	2858	2858	2896
	3164	3138	2919	3063	3063	3063	2549	2174	2204	2457	2526	2424	2391	2338	2337	2413	2858	2227	2858
Δ	0	0	407	247	247	215	0	0	420	0	0	358	391	0	0	347	0	631	38
EST 448	1443	1660	1303	767	779	726	565	560	620	1497	1152	1604	1604	1231	1364	1615	796	1541	746
	671	1588	1303	669	664	649	565	546	495	1304	1152	1106	1106	1053	1364	1098	796	699	746
Δ	771	71	0	98	115	77	0	14	125	193	0	498	498	177	0	516	0	842	0
EST 462	1053	1101	1106	1137	1140	1162	1297	1350	1447	997	984	997	997	1027	1048	1027	1832	1552	1506
	988	1101	991	1137	1135	1162	1297	1350	1312	997	984	997	997	1027	1048	1027	1832	1135	1506
Δ	65	0	115	0	5	0	0	0	135	0	0	0	0	0	0	0	0	417	0
EST 552	2207	1903	1831	2939	2927	2972	1568	1464	1421	1615	1671	1766	1766	1425	1701	1701	1953	2539	2242
	1771	1583	1831	2243	2121	2228	1292	1464	1421	1487	1671	1648	1648	1425	1508	1594	1668	1940	2005
Δ	436	320	0	696	806	744	275	0	0	128	0	117	117	0	193	108	285	599	237

continua

Grupo	<i>T. cruzi</i> II			rDNA 1/2			<i>T. cruzi</i> I			Zimodema 3								rDNA 1/2	
Marcador	CL Br	Esm	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu	JJ	Rb3	Rb8	Rb10	4166	4167	4176	3663	B147	115
EST 580	1025	616	626	1013	1045	1098	624	655	658	707	702	707	702	696	654	677	810	1026	810
	644	583	626	661	682	725	624	655	658	707	702	707	702	662	654	677	640	644	640
Δ	381	33	0	353	363	373	0	0	0	0	0	0	0	34	0	0	171	382	171
EST 582	1131	772	615	1188	1220	1259	559	600	611	893	822	1025	1025	865	746	1004	674	1026	674
	631	701	615	1005	1033	1069	491	600	565	722	727	742	742	767	746	710	674	701	674
Δ	500	71	0	182	188	190	68	0	47	172	96	283	283	98	0	294	0	325	0
5S	1685	1706	1697	1627	1645	1681	1359	1420	1511	2457	2127	2263	2263	2212	2242	2256	1469	1713	1469
	1459	1706	1697	1077	1052	1130	1359	1420	1359	2457	2127	2263	2263	2212	2242	2256	1222	1515	1222
Δ	226	0	0	550	592	551	0	0	153	0	0	0	0	0	0	0	247	198	247

3.1.8 Polimorfismo de tamanho cromossômico em isolados de quatro grupos de *T. cruzi*

O número de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes de isolados de Zimodema 3 e a correspondente variação em tamanho foram determinados após a análise do padrão de hibridação de nove sondas (Figura 3.12). A maior variação no número e tamanho de cromossomos homólogos foi observada em NR cl3 (8/9; 88,8%), SO3 cl5 (8/9; 88,8%), SC43 cl1 (8/9; 88,8%), B147 (8/9; 88,8%) e em CL Brener (7/9; 77,7%) seguido pela cepa YuYu (6/9; 66,6%). A porcentagem de homólogos de tamanhos diferentes foi mais baixa (0-55% das sondas) para os putativos isolados não híbridos e também para o isolado 115. A variação de tamanho mais representativa entre cromossomos homólogos dos isolados híbridos foi entre 75 e 475 kb (Figura 3.12).

Figura 3.12. Número de pares de homólogos de 19 isolados de *T. cruzi* que apresentam diferenças de tamanho (ordenada). No painel do lado esquerdo mostra-se a divisão das diferenças de tamanho em 5 classes

3.1.9 Análise Fenética com dados de cariótipo molecular de quatro grupos de *T. cruzi*

A combinação dos dados de três membranas diferentes e das nove sondas compartilhadas por eles, permitiu definir a matriz de distâncias (em kb) aplicando o índice aCSDI para cada par de isolados (Tabela 3.6). Esta matriz foi transformada em um dendrograma pelo algoritmo UPGMA (Figura 3.13). Quatro grupos de isolados foram reconhecidos (veja abaixo). No grupo A, estão localizados os híbridos putativos: CL Brener, isolados de grupo 1/2 (NR, SO3, SC43 B147 e 115) e um isolado de Zimodema 3 (3663). No grupo B, duas cepas de *T. cruzi* II (Esmeraldo e Y); no grupo C três isolados de *T. cruzi* I (Dm28c, Silvio e YuYu) e no grupo D, sete isolados de Zimodema 3.

Tabela 3.6 - Distâncias obtidas com o índice da diferença absoluta de tamanho cromossômico em 19 isolados (aCSDI)

	CL Brener	Esmeraldo	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu	JJ	Rb3	Rb8	Rb10	4166	4167	4176	115	B147	3663
CL Brener	0																		
Esmeraldo	4633	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y	3699	2917	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NR	4088	6784	6040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SO3	4110	6769	6016	382	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC43	3833	7453	6134	1088	1110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dm28c	6947	6184	5752	7177	7137	7681	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Silvio	8302	7364	7086	8475	8439	9137	2347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
YuYu	8160	6774	7183	8444	8466	9150	3065	2898	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JJ	7335	6881	6909	10032	10038	10446	8163	8646	8118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rb3	8079	7982	7283	9965	9913	10345	8004	7759	9106	3652	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rb8	8054	8079	8039	10472	10420	10842	9565	9161	10313	3821	1797	0	0	0	0	0	0	0	0
Rb10	7649	7665	7625	10067	10015	10447	9151	8681	9832	3503	1846	480	0	0	0	0	0	0	0
4166	7846	7766	7315	9729	9719	10190	7223	6096	7663	3300	2607	3394	2952	0	0	0	0	0	0
4167	8836	7823	7604	10998	10990	11461	8545	7548	9283	3761	1978	2240	2237	2094	0	0	0	0	0
4176	7839	7587	7738	10261	10221	10692	8908	8483	9634	3543	1893	701	450	2854	2032	0	0	0	0
115	4182	7415	5901	4160	3867	3346	6511	7644	7539	9809	9629	10126	9769	9385	10655	10013	0	0	0
B147	3166	6198	5024	4897	4895	4758	6730	7336	7223	7739	8525	8080	7610	7837	8783	7785	4115	0	0
3663	4771	6675	5231	5956	5961	5730	5087	6363	6369	8745	8484	9420	9016	8408	9382	9105	3727	4808	0

Figura 3.13. Análise Fenética. Dendrograma obtido pelo algoritmo UPGMA com dados de cariótipo molecular de dezenove isolados de *T. cruzi* obtido a partir de nove sondas. (A) Híbridos e Z3 (3663); (B) *T. cruzi* II; (C) *T. cruzi* I; (D) Zimodema 3

3.1.10 Análise de RFLP com várias enzimas de restrição

No estudo descrito no item 3.1.5, analisamos o polimorfismo de fragmentos de restrição obtidos com a enzima *Pst* I e com estes dados construímos uma matriz de distâncias de Jaccard cujo dendrograma resultante permitiu identificar três grupos de cepas (Figura 3.6 B). Uma pergunta que levantamos foi: qual seria a topologia do dendrograma se outras enzimas de restrição fossem utilizadas ?

Para responder a esta pergunta, submetemos o DNA genômico de cinco isolados de *T. cruzi* (CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5, Dm28c e Sílvia X10 cl1) à digestão independente com nove enzimas de restrição (*Pst* I, *Not* I, *Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl* II, *Xho* I, *Eco* RV, *Spe* I e *Sac* I), num total de 45 misturas de reação. O DNA de

cada um dos isolados também foi digerido com a soma das nove enzimas. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por fluorescência de brometo de etídio (Figura 3.14 A). Após eletroforese, o DNA foi transferido para membrana de náilon, imobilizado e hibridado com a sonda TENF 0462. A Figura 3.14 B apresenta o padrão obtido após auto-radiografia.

Isolados	Posição
CL Brener	1, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 41, 46
Esmeraldo cl3	2, 7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42, 47
SO3 cl5	3, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38, 43, 48
Dm28c	4, 9, 14, 19, 24, 29, 34, 39, 44, 49
Silvio X10 cl1	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50

Figura 3.14. (A) Fragmentos de restrição de DNA genômico de *T. cruzi* visualizados em gel de agarose por fluorescência de brometo de etídio; (B) Auto-radiografia do *Southern blot* hibridado com a sonda TENF 0462. As nove enzimas e a disposição dos cinco isolados no gel estão indicadas. Σ = somatório de enzimas

A partir da auto-radiografia foi feita uma análise quanto à presença ou ausência de fragmentos de restrição (caracteres) reconhecidos pela sonda em um

dado locus. A reação de digestão de CL Brener com *Pst* I não foi eficaz (Figura 3.14 A), portanto, a análise foi feita com o resultado de 8 enzimas de restrição. A presença ou ausência de cada fragmento de restrição compartilhado foi codificada por 1 ou 0, e os resultados obtidos foram organizados em uma matriz de caracteres binários (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Matriz de caracteres para análise fenética de RFLP. A presença ou ausência de cada fragmento de restrição foi codificada por 1 ou 0

	CL Brener	Esmeraldo	SO3 cl5	Dm 28c	Silvio
<i>Not</i> I	0	1	1	0	1
	1	0	0	1	0
<i>Eco</i> RI	1	1	1	0	0
	0	0	0	1	1
<i>Bam</i> HI	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	0
<i>Bgl</i> II	1	1	1	0	0
	0	0	0	1	1
<i>Xho</i> I	0	0	1	0	0
	0	1	1	0	0
<i>Eco</i> RV	0	0	1	0	0
	0	0	1	0	0
<i>Spe</i> I	1	1	1	1	0
	0	0	0	1	1
<i>Sac</i> I	1	1	1	0	0
	1	1	1	0	0
	0	0	0	1	1

A análise dos fragmentos de restrição reconhecidos pela sonda permitiu a construção de uma matriz de distâncias de Jaccard (Tabela 3.8) elaborada a partir de uma matriz de caracteres binários (Tabela 3.7). A matriz de distâncias foi usada na construção de um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 3.15). Um teste de *bootstrap* foi aplicado aos dados de RFLP usando 10 000 réplicas.

Tabela 3.8 - Matriz de distâncias entre 5 isolados de *T. cruzi* obtida a partir da matriz de caracteres de fragmentos de restrição de oito enzimas

	CL Brener	Esmeraldo	SO3 cl5	Dm 28c	Silvio
CL Brener					
Esmeraldo	0,61538				
SO3	0,38889	0,52941			
Dm28c	0,23529	0,22222	0,18182		
Silvio	0,11765	0,17647	0,14286	0,53846

Figura 3.15. Dendrograma obtido a partir da matriz de distâncias de dados de RFLP de 5 isolados de *T. cruzi* digeridos com 8 enzimas de restrição. Os valores obtidos após o teste de *bootstrap* estão indicados

O dendrograma obtido permite encontrar dois grupos principais. Um grupo onde se situam CL Brener, Esmeraldo e SO3 cl5 (*T. cruzi* II e rDNA 1/2), e outro grupo onde estão Dm28c e Silvio (*T. cruzi* I). O teste de reamostragem por *bootstrap* revelou que os grupos podem ser considerados consistentes (*bootstrap* 100). Em termos gerais a topologia está de acordo com nosso resultado anterior obtido com a enzima *Pst* I (Figura 3.6 B) onde o grupo C (*T. cruzi* I) estava bem separado dos grupos E (*T. cruzi* II) e D (rDNA 1/2).

3.2 Cistron ribossômico

Nota: Parte dos resultados descritos a seguir consta do artigo: STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* stocks. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam v. 4072, p.1-8, 2003. (Anexo B).

Em 1996 Souto et al. mostraram que os isolados do grupo de rDNA 1/2, considerados híbridos, contém dois tipos de cistrons ribossômicos, cada um correspondente àquele encontrado nos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II.

Para avaliar a distribuição de cada tipo de cistron nos cromossomos dos isolados do grupo de rDNA 1/2 (NR cl3 e SO3 cl5), o DNA cromossômico de quatro isolados foi separado por PFGE e transferido para membranas de náilon. Tiras foram independentemente hibridadas com a sonda de rDNA 24S α , e com sondas contendo o domínio D7 do rDNA 24S α de CL Brener (classificado como *T. cruzi* II, sonda D7-1) e de Dm28c (classificado como *T. cruzi* I, sonda D7-2) (Figura 3.16). Diferentes bandas cromossômicas foram reconhecidas pela sonda de rDNA 24S α : uma banda de 1,35 Mb em CL Brener; duas bandas de 1,5 e 1,1 Mb em NR cl3 e SO3 cl5; e três bandas de 1,9; 1,6 e 1,2 Mb em Dm28c (Figura 3.16). A sonda contendo o domínio D7-1 hibridou com o cromossomo de CL Brener, e com as duas bandas dos isolados de grupo 1/2. Por outro lado, a sonda contendo o domínio D7-2 hibridou com os cromossomos de Dm28c e com a banda de 1,5 Mb dos isolados do grupo 1/2 (Figura 3.16).

A distribuição dos dois tipos de cistrons ribossômicos nas duas bandas do isolado SO3 cl5 foi investigada em doze frações do gel de agarose (PFGE), que separavam as bandas cromossômicas entre 1,0 e 1,6 Mb de tamanho. O DNA foi extraído das frações do gel e submetido à amplificação do domínio D7 com os iniciadores D71 e D72 (SOUTO; ZINGALES, 1993) (Figura 3.17). Um produto intensamente corado de 110 pb, característico de cistrons de tipo 2, foi observado na banda de 1,5 Mb juntamente com um produto de muito fraca intensidade de 125 pb (característico do cistron de tipo 1). Este resultado corrobora os dados de hibridização com a banda cromossômica de 1,5 Mb obtidos com as sondas de D7-1 e

D7-2 nos dois isolados do grupo de rDNA 1/2 (Figura 3.16). Produtos de amplificação de 110 pb de intensidade fraca foram obtidos para DNA cromossômico de mais baixo tamanho molecular (Figura 3.17). Este resultado possivelmente é originado pela degradação do DNA e espalhamento durante a corrida eletroforética. Por outro lado, um produto intensamente corado de 125 pb, juntamente com um produto mais fraco de 110 pb é observado na banda de 1,1 Mb (Figura 3.17). O conjunto de dados sugere que nos isolados de rDNA 1/2 os genes de rDNA do tipo 2 estão concentrados na banda de 1,5 Mb, e que os cistrons de tipo 1 seriam principalmente segregados na banda de 1,1 Mb, juntamente com algumas cópias de genes de tipo 2.

Figura 3.16. Southern blot de DNA cromossômico de isolados de *T. cruzi* hibridado com seqüências do cistron ribossômico. Hibridação com sondas de rDNA 24Sα; de domínio D7 de CL Brener (sonda D7-1); e de domínio D7 de Dm28 (sonda D7-2)

Figura 3.17. Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio para a análise da amplificação dos domínios D7 do isolado SO3 cl5 com os oligonucleotídios D71/D72. Raias: sem DNA; DNA genômico; DNA extraído das bandas cromossômicas cortadas do gel de PFGE (tamanhos estimados em Mb)

3.3 Número de cromossomos e tamanho do genoma de isolados de *T. cruzi*

Nota: Parte dos resultados descritos a seguir consta do artigo: VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, A. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam v. 138 (1), p.131-141, 2004. (Anexo C).

O número de cromossomos em CL Brener foi estimado por diferentes autores por diferentes abordagens. Em 1995, Cano et al. determinaram por análise densitométrica da intensidade de fluorescência de brometo de etídio e do sinal de hibridação de sondas teloméricas que o número de cromossomos de CL Brener era 64. Henriksson et al. (1995) estimaram oitenta cromossomos com base no tamanho aproximado de um cromossomo e do tamanho do genoma nuclear.

Para analisar a divergência encontrada na literatura, estimamos o número de cromossomos em CL Brener com base na densitometria de bandas cromossômicas coradas com SYBR Green I. Este corante possui a propriedade de ligar-se ao DNA independentemente de sua composição de bases e com uma sensibilidade maior do que o brometo de etídio e foi usado para quantificação de quebras em DNA dupla fita em amostras separadas por PFGE (KILTIE; RYAN, 1997). Para analisar e

quantificar os valores de fluorescência das bandas cromossômicas coradas com SYBR Green I, elaboramos um modelo matemático e fizemos uma simulação com dados pré-determinados para verificar a validade do modelo.

3.3.1 Simulação de análise de cromossomos corados com SYBER Green I

Nota: Estes dados não foram publicados.

Considerando que a fluorescência após coloração com SYBER Green I seja equivalente à área sob o pico obtido por densitometria, ela poderia ser calculada como segue:

$$F = k \times N \times T + b$$

onde F = fluorescência; k = constante de proporcionalidade; N = número de cromossomos por banda; T = número de kb por molécula; b = coeficiente linear.

As premissas deste modelo são: (i) se todas as bandas tiverem o mesmo número de cromossomos, então $F_1 - b / T_1 = \text{constante} = F_2 - b / T_2$ etc. e (ii) a menor razão $F - b / T$ corresponde a um cromossomo. Desse modo, simulamos a estimativa do número de cromossomos para CL Brener, usando dados hipotéticos: (i) o número de cromossomos é 46; (ii) há vinte bandas cromossômicas contendo números arbitrários de cromossomos em cada uma; (iii) a amostra é representada por cem células; (iv) na equação acima, o coeficiente linear (b) tem valor = 2; e (v) a constante de proporcionalidade (k) = 1000.

A Tabela 3.9 mostra os valores de fluorescência estimados para uma e cem células de CL Brener em cada uma das vinte bandas cromossômicas.

Tabela 3.9 - Simulação para a análise de dados de fluorescência. Nota: Os valores hipotéticos de cromossomos de cada banda e os valores dos tamanhos moleculares foram usados para estimar a fluorescência em células de CL Brener

N hipotético ^a	T (kb) ^b	F1 = k x N x T+ b ^{c,e}	F100 = 100 x F1 ^d
2	3500	15000	1500000
2	3350	14400	1440000
1	2750	6500	650000
1	2600	6200	620000
3	2300	14800	1480000
2	1600	7400	740000
5	1500	16000	1600000
1	1350	3700	370000
6	1250	16000	1600000
4	1180	10440	1044000
2	1100	5400	540000
2	1030	5120	512000
2	950	4800	480000
3	900	6400	640000
3	850	6100	610000
1	800	2600	260000
2	730	3920	392000
2	700	3800	380000
1	600	2200	220000
1	450	1900	190000
Total = 46			

^a Valores hipotéticos do número de cromossomos por banda.

^b Valores hipotéticos do tamanho molecular da banda cromossômica.

^c F1 = fluorescência de uma célula.

^d F100 = fluorescência de cem células.

^e k = constante de proporcionalidade (valor arbitrário = 2); b = coeficiente linear (valor arbitrário = 1000).

A partir da simulação dos dados, fizemos um gráfico relacionando os tamanhos moleculares das bandas cromossômicas com os valores de fluorescência estimados na Tabela 3.9 para verificar se há uma relação linear entre eles (Figura 3.18).

Figura 3.18. Variação dos valores de fluorescência hipotéticos (F) em função dos tamanhos cromossômicos de CL Brener (kb)

O gráfico permite observar que não há uma relação linear entre todos os pontos obtidos. Desta forma, construímos um gráfico com onze pontos, incluindo os tamanhos máximos e mínimos, cuja relação é linear (Figura 3.19).

Figura 3.19. Relação linear entre valores de fluorescência hipotéticos (F) e os tamanhos cromossômicos de CL Brener (kb). A reta e a equação de regressão linear estão indicadas (R = coeficiente de regressão linear de Pearson)

A partir da regressão linear de sete pontos obteve-se uma equação de reta ($R = 0,9856$) cujo coeficiente angular é 422,42 e o coeficiente linear 36177. Este valor foi usado para corrigir os valores de fluorescência obtidos para cada uma das bandas cromossômicas. As razões entre os valores de fluorescência corrigida (Fc) e os tamanhos cromossômicos (T) foram normalizados (Nz) para a determinação do número de cromossomos em cada banda. Para a normalização, a média dos dois menores valores da razão Fc/T foi usada como divisor dos demais valores. Os valores de fluorescência sem correção foram analisados analogamente para efeito de comparação (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 – Simulação para a análise de dados de fluorescência – Correção dos dados.

Nota: Os valores de fluorescência com e sem correção (Fc e F) foram usados para a determinação do número (N) de cromossomos de CL Brener

T (kb) ^a	Valores corrigidos				N ^c hipotético	Valores sem correção			
	Fc ^b	Fc/T	Nz ^d	N ^c obtido		N ^c obtido	F ^b	F/T	Nz ^d
3500	1463823	418,2	1,9	2	2	2	1500000	428,6	1,8
3350	1403823	419,1	1,9	2	2	2	1440000	429,9	1,8
2750	613823	223,2	1,0	1	1	1	650000	236,4	1,0
2600	583823	224,5	1,0	1	1	1	620000	238,5	1,0
2300	1443823	627,7	2,8	3	3	3	1480000	643,5	2,7
1600	703823	439,9	2,0	2	2	2	740000	462,5	2,0
1500	1563823	1042,5	4,7	5	5	5	1600000	1066,7	4,5
1350	333823	247,3	1,1	1	1	1	370000	274,1	1,2
1250	1563823	1251,1	5,6	6	6	5	1600000	1280,0	5,4
1180	1007823	854,1	3,8	4	4	4	1044000	884,7	3,7
1100	503823	458,0	2,0	2	2	2	540000	490,9	2,1
1030	475823	462,0	2,1	2	2	2	512000	497,1	2,1
950	443823	467,2	2,1	2	2	2	480000	505,3	2,1
900	603823	670,9	3,0	3	3	3	640000	711,1	3,0
850	573823	675,1	3,0	3	3	3	610000	717,6	3,0
800	223823	279,8	1,2	1	1	1	260000	325,0	1,4
730	355823	487,4	2,2	2	2	2	392000	537,0	2,3
700	343823	491,2	2,2	2	2	2	380000	542,9	2,3
600	183823	306,4	1,4	1	1	2	220000	366,7	1,6
450	153823	341,8	1,5	1	1	2	190000	422,2	1,8
	Total		46,4	46	46	47	Total		46,8

^a T, tamanho molecular da banda cromossômica em kb.

^b Fc, Fluorescência corrigida; F, Fluorescência não corrigida.

^c N, número de cromossomos por banda.

^d Nz, valores normalizados.

O número de cromossomos de CL Brener obtido usando valores de fluorescência corrigidos (Fc) e não corrigidos (F) foi 46 e 47, respectivamente. Desta forma, verifica-se que a metodologia usando valores corrigidos de fluorescência resgata o valor de cromossomos atribuído arbitrariamente a cada banda cromossômica.

Uma vez que, com o resultado da simulação, resgatamos o número total de cromossomos e também o número de cromossomos por banda pré-definidos, submetemos os dados experimentais de fluorescência das bandas cromossômicas de CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5, Sílvia X10 cl1 e *S. cerevisiae* ao método de análise desenvolvido.

Os cromossomos de *S. cerevisiae* e dos quatro isolados de *T. cruzi* foram separados por PFGE. O gel de agarose foi corado com SYBR Green I e submetido à digitalização no aparelho Storm (Molecular Dynamics). A análise densitométrica foi feita usando o aplicativo *ImageQuant* (Molecular Dynamics). A Figura 3.20 mostra os picos correspondentes às bandas cromossômicas de *S. cerevisiae* e dos isolados de *T. cruzi*.

A área abaixo de cada pico corresponde ao número de *pixels* ao longo da raia analisada. Quanto maior a fluorescência maior o seu valor. Desta forma, foram obtidas as áreas de cada pico correspondente a uma banda cromossômica.

Figura 3.20. Análise densitométrica de cromossomos separados por PFGE. **A** – *S. cerevisiae*; **B** – CL Brener; **C** – Esmeraldo cl3; **D** – SO3 cl5; **E** – Silvio X10 cl1. Abscissa: distância de migração (mm); Ordenada: intensidade de fluorescência

3.3.2 Análise do número de cromossomos de *S. cerevisiae*

Para validar com dados reais o modelo de análise densitométrica, usamos os cromossomos de *S. cerevisiae* (cepa diplóide), cujo número ($n=16$) e tamanho molecular são conhecidos. A Tabela 3.11 relaciona os valores das áreas dos picos, assinalados como valores de fluorescência, aos tamanhos moleculares dos cromossomos de levedura.

Tabela 3.11 – Relação entre os valores de fluorescência (F) obtidos por densitometria e os tamanhos moleculares (kb) dos cromossomos de levedura

# Pico	F	Tamanho (kb)
1	487,11	1900
2	501,77	1640
3	232,37	1120
4	507,51	1110
5*	517,23	945
6	397,42	915
7*	465,09	815
8*	426,55	785
9	303,78	745
10*	417,69	680
11*	401,48	610
12*	375,55	555
13*	306,76	450
14*	284,99	375
15*	250,61	295
16*	227,64	225

* Picos cujas áreas e tamanhos moleculares mantêm uma relação linear

Um gráfico relacionando os valores de fluorescência aos respectivos tamanhos cromossômicos foi construído para verificar se havia uma relação linear entre os dados (Figura 3.21).

Figura 3.21. Variação dos valores de fluorescência em função dos tamanhos cromossômicos de levedura

O gráfico permite observar que não há uma relação linear entre todos os pontos obtidos. Dessa forma, construiu-se um gráfico apenas com os dez pontos assinalados na Tabela 3.11 cuja relação é linear (Figura 3.22).

Figura 3.22. Relação linear entre os valores de fluorescência e o tamanho cromossômico (kb) de levedura. A reta e a equação de regressão linear estão indicadas (R = coeficiente de regressão linear de Pearson)

A partir da regressão linear de dez pontos obteve-se uma equação de reta ($R = 0,982$) cujo coeficiente angular é 0,4004 e, o coeficiente linear 137,74. Este valor foi usado para corrigir os valores de fluorescência obtidos para cada uma das bandas cromossômicas de levedura. As razões entre os valores de fluorescência corrigida (F_c) e os tamanhos cromossômicos (T) foram normalizados (N_z) para a determinação do número de cromossomos em cada banda. Para a normalização, o menor valor da razão F_c/T foi usado como divisor dos demais valores. Os valores de fluorescência sem correção foram analisados analogamente para comparação (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Determinação do número de cromossomos por banda em *S. cerevisiae*

Nota: Os valores de fluorescência com e sem correção (Fc e F) foram usados para a determinação do número (N) de cromossomos de *S. cerevisiae*

T ^a (kb)	Valores corrigidos				N ^c observado	Valores sem correção			
	Fc ^b	Fc/T	Nz ^d	N ^c obtido		N ^c obtido	F ^b	F/T	Nz ^d
945	379,5	0,40	1,0	1	1	1	517,2	0,55	1,0
815	327,4	0,40	1,0	1	1	1	465,1	0,57	1,0
785	288,8	0,37	0,9	1	1	1	426,6	0,54	1,0
680	280,0	0,41	1,0	1	1	1	417,7	0,61	1,1
610	263,7	0,43	1,1	1	1	1	401,5	0,66	1,2
555	237,8	0,43	1,1	1	1	1	375,6	0,68	1,2
450	169,0	0,38	0,9	1	1	1	306,8	0,68	1,2
375	147,3	0,39	1,0	1	1	1	285,0	0,76	1,4
295	112,9	0,38	1,0	1	1	2	250,6	0,85	1,6
225	89,9	0,40	1,0	1	1	2	227,6	1,01	1,8
	Total		10,0	10	10	12	Total		12,6

^a T, tamanho molecular da banda cromossômica em kb.

^b Fc, Fluorescência corrigida; F, Fluorescência não corrigida.

^c N, número de cromossomos por banda.

^d Nz, valores normalizados.

Dessa forma, para as dez bandas cromossômicas analisadas, foram encontradas dez bandas cromossômicas usando os dados de fluorescência corrigida e doze bandas com valores não corrigidos.

3.3.3 Análise do número de cromossomos de *T. cruzi*

Uma vez validada a metodologia de análise com os dados de *S. cerevisiae*, ela foi usada com os dados de CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 e Silvio X10 cl1.

Para cada isolado de *T. cruzi* foi construído um gráfico relacionando os valores de fluorescência aos respectivos tamanhos cromossômicos (determinados previamente nos experimentos de PFGE a partir de curvas de calibração usando cromossomos de *S. cerevisiae*, item 3.1) para verificar se havia uma relação linear entre os dados. Em nenhum gráfico houve uma relação linear entre todos os pontos

obtidos. Dessa forma, construíram-se gráficos com pontos cuja relação é linear (incluindo-se os tamanhos dos cromossomos máximos e mínimos) (dados não mostrados).

Os valores dos coeficientes lineares obtidos para as retas de cada isolado foram usados para corrigir os valores de fluorescência obtidos para cada uma das bandas cromossômicas dos respectivos isolados. As razões entre os valores de fluorescência corrigida (F_c) e os tamanhos cromossômicos (T) foram normalizados (N_z) para a determinação do número de cromossomos em cada banda. Na Tabela 3.13 também é computado o número total de cromossomos de cada isolado, mostrando a estimativa de 52, 65, 72 e 44 cromossomos, respectivamente, para CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 e Sílvia X10 cl1. O tamanho do genoma de cada isolado foi estimado pelo somatório do número de cromossomos de cada banda multiplicado pelo seu respectivo tamanho molecular. Um genoma de aproximadamente 70 Mb foi estimado para CL Brener. Valores de 47 e 78 Mb foram obtidos, respectivamente, para Sílvia X10 cl1 e Esmeraldo cl3. O maior genoma, de 94,7 Mb, foi calculado para o isolado híbrido SO3 cl5.

Tabela 3.13 – Número e tamanho das bandas cromossômicas e número de cromossomos por banda de isolados de *T. cruzi*

CL Brener			Esmeraldo cl3			SO3 cl5			Silvio X10 cl1		
A ^a	B ^b	C ^c	A	B	C	A	B	C	A	B	C
20	3,26	2	19	3,26	2	22	3,26	3	17	2,70	1
19	2,87	3	18	2,50	2	21	2,74	3	16	2,32	2
18	2,60	1	17	2,32	2	20	2,38	2	15	2,00	2
17	2,44	2	16	2,07	1	19	2,18	1	14	1,70	2
16	2,21	2	15	1,95	2	18	2,02	3	13	1,42	3
15	1,64	2	14	1,55	4	17	1,72	3	12	1,29	3
14	1,50	3	13	1,44	6	16	1,62	3	11	1,17	3
13	1,41	2	12	1,34	7	15	1,54	5	10	1,06	4
12	1,30	2	11	1,23	2	14	1,43	4	9	0,99	1
11	1,22	2	10	1,18	2	13	1,33	3	8	0,91	3
10	1,18	1	9	1,09	5	12	1,18	6	7	0,82	3
9	1,13	7	8	0,96	3	11	1,09	2	6	0,75	3
8	1,04	6	7	0,87	3	10	1,00	4	5	0,72	3
7	0,97	4	6	0,84	3	9	0,99	5	4	0,67	2
6	0,89	2	5	0,79	2	8	0,91	3	3	0,62	7
5	0,76	2	4	0,72	9	7	0,87	1	2	0,57	2
4	0,69	3	3	0,59	8	6	0,79	5	1	0,51	1
3	0,64	2	2	0,55	1	5	0,75	3			
2	0,59	1	1	0,53	1	4	0,66	7			
1	0,50	1				3	0,60	1			
						2	0,55	3			
						1	0,46	3			
N ^d			52			65			72		
S ^e			69,6			78,5			94,7		
									46,8		

^aA: As bandas cromossômicas foram numeradas em algarismos arábicos.

^bB: Tamanho da banda cromossômica em Mb.

^cC: Número de cromossomos por banda estimado por análise densitométrica.

^dN: Número total de cromossomos.

^eS: Tamanho do genoma estimado por análise densitométrica.

“The oracle of Delphi had the habit of questioning passers-by. One of the questions told the following story. I have a boat made of wooden planks. As time elapses they rot one after the other. At some time no original plank still remains in the boat: is it the same boat? Clearly the owner will say, yes. And he will be right. The boat is not the matter of the boat, but something else, much more interesting, that orders the matter of the planks: it is the relationship between the planks.

(...) This is why the genomes cannot be considered simply as collections of genes.”

Antoine Danchin

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise Fenética

A escola “fenética”, como escola taxonômica, surgiu no final da década de 50 juntamente com os primeiros computadores disponíveis nos Estados Unidos que possibilitaram a execução de operações numéricas extensas, antes inviáveis. As bases conceituais da escola surgem no início da década de 60, com “The principles of numeric taxonomy” de Sokal e Sneath (1963). Análises numéricas de semelhanças médias para um conjunto grande de caracteres de determinada espécie passaram a ser possíveis (AMORIM, 1994).

O método fenético (do inglês *phenetic* = *phenotype* + *genetic*) dá um tratamento numérico a matrizes de dados, produzindo diagramas ramificados – ou fenogramas – em que a reunião ou separação de táxons faz-se com base na média da semelhança total dos caracteres apresentados na matriz de dados. Supõe-se que quanto maior o número de caracteres inseridos em um grupo, maior a estabilidade do sistema, uma vez que, com isso se aproximaria cada vez mais do número total de caracteres. Os filogeneticistas criticam esse argumento dizendo que não importa quanta informação se utiliza para construir um sistema, e sim quanta informação alguém pode tirar da classificação proposta. Do ponto de vista evolutivo, a maior fragilidade do sistema fenético é ontológica, pois, um táxon construído feneticamente expressa apenas que, em um conjunto de espécies reunidas, elas são mais semelhantes entre si que qualquer uma delas em relação a outras que não pertençam ao grupo. O fenograma informa apenas que há uma maior semelhança entre grupos.

Assim, não se pode determinar *a priori* a que tipo de agrupamento (do ponto de vista genealógico) os táxons fenéticos correspondem. O resultado da análise indica classes abstratas, descomprometidas da realidade temporal (AMORIM, 1994).

Entretanto, é possível um fenograma corresponder a uma filogenia definida do ponto de vista da cladística. Diferentes espécies podem compartilhar estados de caráter similares por três motivos:

- 1- Elas compartilham uma apomorfia (estado de caráter derivado) que evoluiu no seu ancestral comum. Por exemplo, a placenta é uma característica que une cavalos e humanos, e exclui lagartos. Este tipo de compartilhamento recebe o nome de sinapomorfia.
- 2- Elas compartilham uma plesiomorfia (estado de caráter primitivo) em relação a outras espécies. Iguanas e humanos compartilham a condição primitiva de cinco dedos (artelhos), considerando que cavalos, com apenas um dedo, têm um estado derivado. Com relação ao ancestral pentadáctilo dos tetrápodos, os cavalos evoluíram mais rapidamente neste aspecto do que iguanas e humanos. Esta diferença na taxa de evolução resulta em uma maior diferença (neste caráter) entre humanos e cavalos, do que entre humanos e iguanas, mesmo embora humanos e cavalos possuam um maior grau de parentesco. Este tipo de compartilhamento recebe o nome de simplesiomorfia.
- 3- Elas compartilham um aspecto similar que não é homólogo, mas que evoluiu independentemente (tal como a “nadadeira” dorsal de tubarões e baleias). A evolução independente de um estado de caráter idêntico ou similar em duas ou mais linhagens evolutivas é chamada de homoplasia.

Segundo Futuyma (1998), se não houver homoplasia, e se as linhagens evoluíram a uma taxa constante, então quanto maior o número de diferenças entre duas espécies, mais antiga é a sua divergência de um ancestral comum. Se isto ocorrer, o fenograma obtido pelo método fenético corresponderá à verdadeira árvore filogenética. Mas se as simplesiomorfias e homoplasias forem em maior número do que as sinapomorfias, então o fenograma não representará a verdadeira filogenia.

Uma grande parcela de estudos evolutivos de organismos têm sido feita utilizando-se a análise de seqüências nucleotídicas de genes conservados ou de

regiões intergênicas. Neste caso, o gene do RNA ribossômico 18S e regiões de espaçadores do cistron ribossômico têm sido amplamente utilizadas. Entretanto, a correspondência entre dendrogramas “de um gene” e dendrogramas “de espécies” poderia ser questionada. De fato, apenas genes ortólogos deveriam ser usados e vários genes deveriam ser seqüenciados para confirmar a ortologia e descartar os genes parálogos e xenólogos. A análise de múltiplos genes possibilita explorar diferentes vias metabólicas e assim obter uma compreensão mais global do processo evolutivo. Esta abordagem tem sido feita, embora indiretamente, por eletroforese de enzimas multilocos (MLEE) (BAÑULUS et al., 1999).

O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA, através do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), propiciou um enorme e acelerado conhecimento da biosistemática, evolução e genética de animais e plantas (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). As vantagens dos marcadores do tipo RFLP em relação a marcadores morfológicos, citológicos ou de alozimas/isozimas são: (a) são herdados como marcadores mendelianos livres de efeitos pleiotrópicos; (b) não são afetados pelo ambiente; (c) podem ser obtidos em número elevado; e (d) têm distribuição aleatória no genoma (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Por outro lado, uma outra vertente de pesquisadores está buscando estudar a evolução por uma abordagem holística, no sentido de analisar o genoma como um todo durante o processo evolutivo. Os princípios desta abordagem levam em consideração que os genomas não são simplesmente coleções de genes (definição primitiva proposta por Winkler em 1920), assim como o barco de Delphi não é apenas uma coleção de tábuas de madeira (DANCHIN, 1998), dessa forma, é a relação entre as partes (genes) que constituiria o todo (genoma), e o mapa da célula estaria no cromossomo, ou seja na organização espacial dos genes (DANCHIN, HÉNAUT, 1997). Em 1974, Wilson, Sarich e Maxson revelaram a importância do rearranjo gênico na evolução a partir do estudo comparativo das taxas de evolução cromossômica, protéica e anatômica entre sapos e mamíferos. A conclusão final foi de que os rearranjos gênicos podem ser mais importantes do que mutações pontuais como fontes de mudanças evolutivas na anatomia e modo de vida dos organismos (WILSON; SARICH; MAXSON, 1974).

Poucos estudos evolutivos tinham considerado o arranjo do genoma como um caráter em tripanossomatídeos e outros protozoários, apesar de sua posição filogenética entre procariotos e eucariotos haver sido determinada, até que Dujardin et al. (1995, 1998, 2000) descreveram a análise fenética de populações de *Leishmania* levando em conta rearranjos gênicos em vez de seqüências gênicas (e intergênicas). Os autores desenvolveram um método de análise fenética baseado na premissa de que a distância entre dois organismos é dada pela soma das diferenças absolutas entre o tamanho de seus cromossomos homólogos. Isto se justifica, segundo o autor, na hipótese de que o rearranjo gênico pode tanto induzir quanto refletir mudanças evolucionárias e também que o rearranjo seria fonte de mudanças evolucionárias mais importante que mutações pontuais.

Em 1995, Dujardin et al. definiram um índice (aCSDI) que analisa o polimorfismo de tamanho de cromossomos entre dois organismos. Este índice é calculado pela equação:

$$\text{aCSDI}(ab) = \sum_i (|L_{ai} - L_{bi}| + |S_{ai} - S_{bi}|),$$

onde L e S são, respectivamente, o tamanho do maior e do menor cromossomo reconhecido pela sonda i nos isolados a e b . Quando apenas uma banda cromossômica é reconhecida pela sonda, seu tamanho é incluído nos dois termos da equação como sendo L e S . Em seguida, uma matriz de distâncias é construída com os valores dos índices de cada par de isolados. O uso de algoritmos como UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973), *Neighbor-Joining* (agrupamento de vizinhos) (SAITOU; NEI, 1987) ou Fitch-Margoliash (FITCH; MARGOLIASH, 1967) aos dados desta matriz permite a reconstrução das topologias.

É importante salientar que esta abordagem leva em conta que uma elevada parcela de tripanossomatídeos é diplóide (GIBSON et al., 1986). No caso específico de *T. cruzi* várias evidências experimentais apontam para esta conclusão (TIBAYRENC et al., 1986; HENRIKSSON, et al., 1990; 1995; HENRIKSSON, PETTERSON, SOLARI 1993; HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996). Além disto, a análise do cariótipo molecular de *T. cruzi* indica que muitos

cromossomos homólogos não apresentam o mesmo tamanho molecular, resultado, possivelmente, da amplificação desigual de seqüências reiteradas (HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996).

No presente estudo, o cariótipo molecular de *T. cruzi* permitiu inferir hipóteses evolucionárias em dezenove isolados do parasita a partir do polimorfismo de tamanho cromossômico. Estes isolados pertencem aos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, definidos por um grupo de expertos (RECOMMENDATIONS..., 1999) e aos grupos de rDNA 1/2 e Zimodema 3. Inicialmente mapeamos nas bandas cromossômicas de nove isolados (três de *T. cruzi* I, três de *T. cruzi* II e três de grupo de rDNA 1/2), dezoito ESTs de CL Brener e seqüências de oito genes clonados. As 26 seqüências estão distribuídas em dezoito das vinte bandas cromossômicas de CL Brener (de 0,45 a 3,5 Mb) e, portanto, cobrem grande extensão do genoma do parasita. Além disto, o mapeamento cromossômico em nove isolados sugere que as seqüências analisadas não constituem qualquer grupo sintênico (Tabela 3.2). A análise regular dos géis de PFGE durante um período de seis anos demonstrou que os cariótipos moleculares se mantêm estáveis em culturas prolongadas.

Os padrões de coloração com brometo de etídio e de hibridação das sondas indicaram que isolados dos grupos de *T. cruzi* II e de rDNA 1/2 apresentam um aumento do tamanho molecular em vários cromossomos quando comparado com isolados de *T. cruzi* I. Esta observação está de acordo com conclusões prévias baseadas na análise do cariótipo de 25 isolados e foi interpretada como um evento de especiação, que suporta a relação distante entre os dois principais grupos de *T. cruzi* (HENRIKSSON; ASLUND; PETTERSSON, 1996). Adicionalmente, isto pode sugerir que o tamanho dos genomas de *T. cruzi* II e do grupo de rDNA 1/2 seria maior do que o de *T. cruzi* I. Esta hipótese foi corroborada nos experimentos em que o tamanho do genoma dos isolados foi determinado a partir da intensidade de fluorescência com SYBER Green I (Item 4.3). A análise do cariótipo de um número maior de isolados seria necessária para uma conclusão definitiva. Dados da Fig. 3.2 mostram diferenças no sinal de hibridação de determinada sonda entre bandas cromossômicas de um mesmo isolado. Isto pode ser devido a: (i) população mista de parasitas; (ii) dissimilaridade entre cópias gênicas; (iii) diferenças no número de cópias gênicas nas bandas cromossômicas; (v) aneuploidia. No entanto, o fato de

dentre os nove isolados, sete serem representados por populações clonadas, afasta, pelo menos em parte, a primeira hipótese.

O dendrograma derivado dos dados de aCSDI de 21 sondas definiu três grupos que correspondem a *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e um grupo representado por isolados do grupo de rDNA 1/2, que são considerados genótipos híbridos (Figura 3.10). É interessante notar que Souto et al. (1996) sugerem como hipótese, que o isolado SC43 cl1 é uma variante do genótipo do grupo de rDNA 1/2, no qual foram perdidas as unidades do cistron do tipo 1. Portanto, o dendrograma obtido com os dados cromossômicos suporta a proximidade dos isolados NR cl3, SO3 cl5 e SC43 cl1, os quais foram classificados como grupo isoenzimático 39 e subgrupo IId por análise de RAPD e MLEE (BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 2000). Esta conclusão contraria análises fenéticas anteriores que empregaram dados de cariótipo molecular (HENRIKSSON et al., 2002), mas não identificaram um grupo de isolados híbridos separado do grupo *T. cruzi* II. A divergência de conclusões obtidas por nosso estudo e de Henriksson et al. (2002) poderia ser resultante do número de sondas utilizadas, de suas características intrínsecas e localização cromossômica. De fato, Henriksson et al. (2002) mapearam seis sondas distribuídas nos cromossomos de 590 a 1.710 kpb de CL Brener, ao passo que no nosso caso, analisamos 18 sondas distribuídas nos cromossomos de 600 a 3.500 kpb do mesmo isolado. Nosso mapeamento atingindo cromossomos de alto tamanho molecular, poderia fornecer informações mais significativas a respeito de processos evolutivos (como por exemplo amplificação ou deleção por *crossing over* desigual e fusão ou fissão cromossômica) resultando numa análise fenética mais abrangente, embora correndo o risco de não identificar polimorfismo de tamanho cromossômico em alguns cromossomos situados na zona de compressão do gel de PFGE (aproximadamente de 0,9 a 1,6 Mb). Nossos dados indicam que no dendrograma obtido a partir da matriz de distâncias aCSDI derivada de 21 sondas, CL Brener pertence ao ramo de *T. cruzi* II. Os três grupos (*T. cruzi* I, *T. cruzi* II e rDNA 1/2) foram robustos independentemente do número de sondas analisadas (entre 3 e 21), exceto que em alguns casos CL Brener esteve ora mais próximo de *T. cruzi* II, ora do grupo de rDNA 1/2 (Figura 3.10). Por outro lado, em diversos dendrogramas, foram observadas diferenças na topologia intragrupo. De um modo geral, estas observações

indicam que a análise de aCSDI é uma abordagem válida para definir grupos taxonômicos, entretanto ela não permite fazer inferências considerando as relações entre os táxons terminais em cada grupo. Para verificar se havia diferenças entre os dendrogramas obtidos por diferentes algoritmos de reconstrução de topologias, usamos o algoritmo *Neighbor-Joining* em algumas simulações, e não encontramos topologias diferentes das obtidas com o algoritmo UPGMA (dados não mostrados).

A alternância de CL Brener entre os grupos *T. cruzi* II e de rDNA 1/2 sugere que CL Brener compartilha caracteres com os dois grupos. Tendo em vista que CL Brener e isolados de rDNA 1/2 são híbridos, isto também pode ser tomado como uma indicação de que CL Brener e os isolados de grupo de rDNA 1/2 podem ter surgido de diferentes processos de troca genética. Várias evidências suportam esta hipótese. Baseado na genealogia de genes nucleares, foi proposto que estes dois grupos de isolados são divergentes e podem ser o resultado de um ou mais eventos de hibridação entre isolados de clados distantes (MACHADO; AYALA, 2001). Baseado na presença dos cistrons de rDNA de tipo 1 e 2 nos isolados do grupo de rDNA 1/2, mas não em CL Brener, Souto et al. (1996) propuseram que isolados de grupo de rDNA 1/2 são resultantes de troca genética entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Além disto, Sturm et al. (2003) determinaram polimorfismos de nucleotídios na região intergênica do gene 1F8 (GONZALES et al., 1985) que permitiram o desenho de sondas específicas para os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (STURM et al., 2003). Os autores verificaram que as duas classes de oligonucleotídios de 1F8 hibridavam em diferentes bandas cromossômicas em isolados de grupo de rDNA 1/2 e CL Brener, comprovando a natureza híbrida dos isolados e sugerindo ter havido troca genética de parte ou de todo o cromossomo (STURM et al., 2003). Em favor desta conclusão, deve ser lembrado que genótipos híbridos foram obtidos experimentalmente por co-infecção de células de mamífero com dois clones distintos de *T. cruzi*, nos quais foram verificadas trocas genéticas, fusão de genótipos parentais e recombinação homóloga (GAUNT et al., 2003).

Para verificar se havia alguma correlação entre o dendrograma obtido com os dados de cariótipo molecular e o obtido por algum outro marcador genético, fizemos análise fenética com dados de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

(RFLP) do DNA genômico dos nove isolados analisados por aCSDI. Para esta análise foram usadas as dezoito sondas hibridadas com o DNA cromossômico.

Considerando a natureza da variação de tamanho dos fragmentos gerados por uma mesma enzima de restrição entre diferentes isolados de *T. cruzi* na análise de RFLP, ela pode ser o resultado de (a) alteração no número e distribuição dos sítios de restrição devido à substituição de bases dentro dos sítios de reconhecimento da enzima, e (b) alterações no DNA devido a adições ou deleções de seqüências (*indels*), ou ainda por alterações no número de cópias de seqüências repetidas em série (*tandemly repeated sequences*) (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Na análise fenética com os dados de RFLP de dezoito sondas também foram observados três grupos (Figura 3.6). As distâncias fenéticas calculadas dos dados de cromossomos e dos padrões de RFLP mostraram estar significativamente correlacionados estatisticamente pelo teste de Mantel (Figura 4.1) ($r = 0,86062$ e $P < 0,0001$). Isto sugere que os rearranjos responsáveis pelo polimorfismo de tamanho cromossômico e as mutações associadas com RFLP estão correlacionadas do ponto de vista evolutivo. Estes resultados parecem indicar que o relógio molecular teve uma taxa similar para ambas abordagens, e ou, que o poder de resolução destes métodos foi similar. De fato, poder-se-ia esperar uma diferença caracterizada por um relógio molecular mais rápido para a análise dos cromossomos pois, para organismos unicelulares, a taxa de mutação/gene/geração, responsável pelos polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP), varia entre 10^{-9} e 10^{-6} , e a frequência de amplificação de DNA ribossômico, a qual leva ao polimorfismo de tamanho cromossômico, é cerca de 5×10^{-3} /geração para *Saccharomyces cerevisiae* (DUJARDIN et al., 1998). Entretanto, os aspectos quantitativos e qualitativos das seqüências de DNA usadas como sondas nas duas abordagens podem ter tido um papel determinante em nossos resultados. Tais congruências entre caracteres genômicos e genéticos reforçam a forte estruturação dos três grupos. Análises filogenéticas baseadas nas seqüências de nucleotídios (ROBELLO et al., 2000; MACHADO; AYALA, 2001) e em marcadores de microssatélites (MACEDO et al., 2001) também tem mostrado a existência de três ou quatro clados em *T. cruzi*.

Figura 4.1. Gráfico de correlação obtido pelo teste de Mantel entre as matrizes de distâncias de Jaccard e de aCSDI

Para investigar qual seria o dendrograma obtido se os fragmentos de restrição fossem obtidos com outras enzimas de restrição, submetemos o DNA genômico de cinco isolados de *T. cruzi* à digestão independente com nove enzimas de restrição. O dendrograma obtido (Figura 3.15) a partir dos dados de RFLP (Figura 3.14) mostra dois grupos principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II mais SO3 (híbrido). Este resultado sugere que a topologia pode ser independente da enzima de restrição empregada, o que reforça a hipótese de estrutura clonal das populações de *T. cruzi*, uma vez que eventos de recombinação frequentes quebrariam a ligação entre estes marcadores e como consequência esperar-se-ia um dendrograma diferente ao obtido. No futuro será interessante hibridar a membrana contendo o DNA dos isolados digerido com nove enzimas (Figura 3.14) com um maior número de sondas, obter o dendrogramas para cada enzima e fazer o teste de Mantel para avaliar a correlação entre os dendrogramas obtidos par a par. O refinamento de análise permitido por esta abordagem poderá contribuir para uma compreensão maior da estrutura clonal de *T. cruzi*.

Um ponto importante que deve ser considerado é que os híbridos podem não representar uma mera descendência F1 e, neste caso, várias combinações de caracteres parentais são esperados. Além disso, muito provavelmente, nós não

estamos analisando os parentais verdadeiros, mas antes, genótipos que são estritamente relacionados a eles. Além do mais, o evento de hibridação poderia ser antigo e os híbridos poderiam ter se propagado clonalmente e acumulado mutações divergentes. As distâncias observadas entre os três grupos (*T. cruzi* I, *T. cruzi* II e híbridos) baseadas nos dados de variação de tamanho cromossômico com dezoito sondas e a baixa frequência de perfis heterozigóticos observada pela análise de RFLP (Figura 3.6) reforça a última hipótese e sugere que cada grupo tem evoluído independentemente.

No presente estudo, também analisamos com dados de cariótipo molecular, a posição de isolados de Zimodema 3 em relação aos isolados de *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e rDNA 1/2. Na literatura a posição do Z3 em relação às duas linhagens principais de *T. cruzi* é controversa. Alguns autores consideram Z3 mais próximo de *T. cruzi* I (MILES et al., 1981; FERNANDES et al., 1998; SANTOS et al., 2002), enquanto outros consideram Z3 mais próximo de *T. cruzi* II (BARNABÉ; BRISSE; TIBAYRENC, 2000; BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 2000; BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000; MACHADO; AYALA, 2001). Nossos resultados baseados no polimorfismo de tamanho cromossômico determinado a partir de nove sondas colocam oito isolados de Z3 distantes de ambos os grupos principais (Fig 3.14). A única exceção é o isolado 3663 de Z3 que foi incluído no grupo de híbridos (CL Brener, NR, SO3, SC43, 115 e B147) (Fig. 3.14). Neste ponto é interessante ressaltar que os isolados 115 e B147 foram classificados como pertencentes ao grupo de rDNA 1/2 por Souto et al. (1996), juntamente com isolados do *clonet* 39 (NR cl3, SO3 cl5 e SC43 cl1). A análise fenética foi capaz de agrupar estes isolados híbridos, embora seu cariótipo molecular seja heterogêneo, conforme pode ser verificado também tanto pelo padrão de fluorescência das bandas cromossômicas e pelos padrões de hibridação das sondas (Figuras 3.1; 3.2; 3.3). A heterogeneidade ocorre provavelmente devido a diferentes eventos de hibridação que originaram cada isolado deste grupo.

Sturm et al. (2003) apresentaram evidências de que isolados de Zimodema 3 são híbridos. Recentemente inferências filogenéticas baseadas nos genes de EF-1 α , Actina-2, DHFR-TS, TR e 18S rDNA confirmaram a natureza híbrida de Z3 (TOMAZI, 2004). Isto poderia justificar a controvérsia encontrada na literatura em

relação à proximidade de Z3 com *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II, uma vez que, dependendo do marcador utilizado, pode-se ressaltar mais o compartilhamento de caracteres com *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II no genoma híbrido de Z3. É interessante ressaltar que vários isolados de Z3 analisados por Sturm et al. (2003), Tomazi (2004) e pelo nosso grupo são coincidentes.

A análise fenética realizada por nós não incluiu os isolados de Z3 no grupo de híbridos onde estão reunidos isolados de rDNA 1/2 e CL Brener. Ao contrário, observamos que 7 dos 8 isolados de Z3 formam um grupo distinto dos demais isolados. Levando em conta as evidências que indicam que Z3 são híbridos, poderíamos supor que os eventos de hibridação que originaram estes isolados são distintos daqueles que originaram o grupo de rDNA 1/2 e CL Brener. A favor desta hipótese, deve ser lembrado que isolados de rDNA 1/2 e CL Brener predominam no ciclo doméstico ao passo que isolados de Z3 estão quase exclusivamente associados ao ciclo silvestre (ZINGALES et al., 1998). Por outro lado, a análise de microssatélites de vários isolados de Z3 (4166, 4167, 4176, JJ, Rb3, Rb8 e Rb10) sugere serem populações policlonais (PIMENTA, 2002). Este fato poderia impossibilitar a realização de análises fenéticas confiáveis. Entretanto, segundo Gaunt et al. (2003), o fato de os microssatélites indicarem mistura de populações pode ser enganoso, uma vez que os múltiplos genótipos de microssatélites podem ser explicados predominantemente por poliploidia, ou mais corretamente por polissomias. De toda forma, uma análise fenética mais confiável para decidir-se a posição de Z3 deveria aguardar a obtenção de clones celulares dos isolados.

Uma observação interessante deste trabalho foi verificar que isolados híbridos (CL Brener, grupo de rDNA 1/2 e Z3) apresentaram maior proporção de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes, quando comparados com isolados não híbridos (Figuras 3.4 e 3.12). Uma exceção seria o isolado YuYu (*T. cruzi* I) (Figuras 3.4 e 3.12). Entretanto, observações de nosso laboratório indicam que este isolado é uma mistura de populações de parasitas (dados não publicados), as quais poderiam ser responsáveis pelo polimorfismo cromossômico. As Figuras 3.2 e 3.3 mostram diferentes padrões de variação de tamanho de cromossomos homólogos em CL Brener e grupo de rDNA 1/2, dando um suporte adicional para a origem evolutiva diferente desses genótipos. Embora o caráter híbrido tenha sido atribuído a

Z3 (STURM et al., 2003), vale ressaltar que os isolados não foram clonados, e isto pode representar uma limitação para qualquer tipo de abordagem de seus cromossomos e/ou de suas seqüências, pois populações policlonais podem levar a conclusões erradas. Entretanto, a análise fenética com os dados de cariótipo molecular parece reconhecer uma similaridade entre estes isolados (Figura 3.13). Desta forma, ou a hipótese de populações policlonais é pouco provável, ou a mistura de populações ocorreu entre genótipos semelhantes. Vale lembrar que os isolados de Z3 aqui estudados são todos originários da região Amazônica.

A diferença de tamanho dos cromossomos homólogos poderia ter sido causada por recombinação homóloga entre cromossomos ou por amplificação de seqüências repetitivas (revisado por DUJARDIN, et al., 2000). Eventos de fusão ou fissão, embora menos freqüentes em tripanossomatídios, poderiam ser responsáveis por diferenças de tamanho mais significantes, como reportado em *Leishmania* (BRITTO et al., 1998). Em nossos estudos não evidenciamos estes eventos em isolados de *T. cruzi*. Outros mecanismos como troca genética, proposto para espécies de *Leishmania* (BLAINEAU; BASTIEN; PAGÈS et al., 1992) e recentemente evidenciados em clones híbridos de *T. cruzi* (GAUNT et al., 2003), assim como processos pseudo-sexuais, como disjunção não-mitótica (BAÑULUS, 2000), podem contribuir para o polimorfismo de tamanho cromossômico. Nós especulamos que trocas genéticas contribuíram para a variação de tamanho observada nos cromossomos homólogos de isolados híbridos de *T. cruzi*. A caracterização das seqüências de DNA envolvidas nestes eventos será necessária para o entendimento dos mecanismos propostos.

Embora todas as linhas clássicas de evidência apontam para o fato de que *T. cruzi* tem uma evolução predominantemente clonal (TIBAYRENC; AYALA, 2002), dados convergentes e acumulativos mostram que alguns grupos de *T. cruzi* são o resultado de eventos de hibridação. Portanto, a troca genética deve ter tido um importante papel na geração da diversidade do parasita. Nossos resultados mostram que cromossomos são caracteres válidos para a identificação de grupos evolucionários, em particular, organismos híbridos em *T. cruzi*. Ressalta-se que o conteúdo gênico e seu arranjo nos cromossomos podem ter implicações nas propriedades biológicas dos isolados de *T. cruzi*.

4.2 Cistron ribossômico

Espécies de RNA ribossômico são geralmente transcritas a partir de uma família de genes relacionados que parecem ser quase idênticos dentro de um dado organismo (HILLIS; DIXON, 1991). Embora a homogeneização gênica das unidades de rDNA pela evolução em concerto (DOVER, 1986) parece ser uma regra, já foi reportado um polimorfismo intragenômico de genes de rRNA. Entre os protozoários, Plasmódios têm uma organização de genes de rDNA peculiar. Os genes de rDNA estão em número baixo de cópias, entre quatro e oito unidades (McCUTCHAN, et al., 1995), dispersos pelo genoma (WELLEMS et al., 1987) e sua transcrição é regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento em que se encontra o parasita (THOMPSON et al., 1999; CARRANZA et al., 1996).

Uma vez que nosso grupo verificou a presença de dois tipos de cistron ribossômico em isolados do grupo de rDNA 1/2 (SOUTO et al., 1996), em estudo posterior analisamos o padrão de transcrição das duas classes de cistrons e sua distribuição nas bandas cromossômicas destes isolados (STOLF et al., 2003). Verificamos que apenas os cistrons de tipo 2 são transcritos nos estágios de epimastigota, tripomastigota metacíclico e tripomastigota de cultura de tecidos. Também observamos que os dois tipos de cistrons de rDNA têm uma distribuição diferencial nas bandas cromossômicas dos isolados do grupo de rDNA 1/2. Enquanto, os genes de rDNA do tipo-2 estão localizados majoritariamente na banda de 1,5 Mb, os cistrons de tipo-1 estão principalmente concentrados na banda de 1,1 Mb (STOLF et al., 2003). Esta disposição sugere que os genes do tipo-1 estão localizados em um contexto cromossômico que torna a sua transcrição difícil ou nula. Além disto, foi observado que construções plasmidiais que contém o gene repórter da cloranfenicol acetil transferase precedido do promotor ribossômico de tipo 1 apresentam baixa atividade de transcrição em isolados de grupo 1/2, ao contrário de construções análogas que contém o promotor ribossômico de tipo 2 (NUNES; CARVALHO; BUCK, 1997) (e observações não publicadas de nosso grupo). Estes dados reforçam as evidências de que apenas cistrons de tipo 2 são expressos nestes isolados e sugerem que fatores de transcrição, além da sequência do

promotor e do contexto cromossômico, devem ter um papel importante na definição da atividade dos promotores de rDNA.

4.3 Número de cromossomos e tamanho do genoma

Para definir o número de cromossomos (*chrôma* (gr.) = cor; *sôma* (gr.) = corpo) por banda e o tamanho do genoma de isolados de *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e grupo de rDNA 1/2, as bandas cromossômicas foram separadas por PFGE e coradas com SYBR Green . Este corante foi usado para quantificação de quebras de DNA dupla-fita em amostras separadas por PFGE (KILTIE; RYAN, 1997). A intensidade de fluorescência das bandas cromossômicas foi determinada pelo aplicativo ImageQuant (Molecular Dynamics). Para a análise dos dados, elaboramos um modelo matemático que leva em consideração que *T. cruzi* é diplóide e que a razão entre o valor de fluorescência de uma banda cromossômica (F) e seu tamanho molecular (M) é uma constante ($F/M = k$). De acordo com este modelo, se todas as bandas têm o mesmo número de cromossomos, todas as razões (F/M) terão o mesmo valor. Este modelo foi validado com as bandas cromossômicas de *S. cerevisiae*, que contém dois cromossomos por banda. Para os isolados de *T. cruzi* obtivemos gráficos M x F. Não observamos saturação do sinal de fluorescência para nenhuma das bandas. Por outro lado, verificamos não haver uma correlação linear para todos os pontos experimentais, provavelmente porque mais de um cromossomo co-migra na mesma banda. O valor mais baixo da razão F/M foi atribuído à banda que continha apenas um cromossomo, e a abundância relativa dos cromossomos nas outras bandas foi estimada (Tabela 3.13). Desta forma, calculamos que os isolados CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 e Silvio X10 cl1 contém, respectivamente, 52, 65, 72 e 44 cromossomos. Entretanto, devido à presença de zonas de compressão no gel de PFGE, principalmente da região de 0,9 a 1,6 Mb aproximadamente, é possível que o número total de cromossomos tenha sido subestimado. Admitindo-se que o erro experimental tenha sido o mesmo para todos os isolados, nossos dados confirmariam que as cepas de *T. cruzi* II apresentam um número de cromossomos maior que o de

cepas de *T. cruzi* I e que o maior número de cromossomos seria verificado em isolados do grupo de rDNA 1/2. Infelizmente, por falta de tempo, não foi possível determinar com base na fluorescência do SYBER Green I o número de cromossomos de isolados do Zimodema 3.

Em 1920, Winkler definiu genoma (do inglês, *genome*, “**genes + chromosomes**”) como o somatório dos genes de uma célula haplóide de um organismo. Posteriormente, as seqüências de DNA não codificante foram descobertas e incluídas na definição original (NAHUM, 2001). A quantidade total de DNA no genoma é uma característica de cada espécie e é denominado valor C. Este varia de $< 10^6$ para um micoplasma até $> 10^{11}$ pb para algumas plantas e anfíbios (LEWIN, 2000). Infelizmente na literatura ainda há divergência quanto ao uso da definição de genoma, que ora é considerado apenas como o somatório dos genes, ora, dependendo do contexto em que é abordado, é haplóide ou diplóide. Neste estudo, adotamos o termo “tamanho do genoma” para definir o conteúdo total de DNA em uma célula de *T. cruzi* diplóide (2C).

O tamanho do genoma de cada isolado foi calculado pelo somatório dos produtos obtidos entre o número de cromossomos por banda e o valor do tamanho da respectiva banda cromossômica. Assim, para CL Brener estimamos um genoma de aproximadamente 70 Mb. Valores de 47 Mb e 78 Mb foram obtidos, respectivamente para Silvio X10 cl1 e Esmeraldo cl3. O maior genoma de 94,7 Mb foi encontrado para o isolado híbrido SO3 cl5. Tomando como referência CL Brener, em termos relativos, teríamos que o genoma de isolados de rDNA 1/2 seria 1,35 vezes maior que o de CL Brener e o de Silvio (*T. cruzi* I), 1,48 vezes menor que o de CL Brener.

Em um trabalho anterior, o número de cromossomos de CL Brener foi estimado em 64 e o tamanho do genoma em 87 Mb (CANO et al., 1995). Este cálculo estava baseado na intensidade de hibridação da sonda telomérica, sob a premissa de que a região telomérica tem o mesmo tamanho em cromossomos distintos. Recentemente mostramos que o tamanho da região telomérica varia entre cromossomos de CL Brener, o que prejudica o uso desta abordagem para a estimativa do número total de cromossomos, e, conseqüentemente, o tamanho do genoma (VARGAS; PEDROSO; ZINGALES, 2004). Por outro lado, a zona de compressão onde co-migram vários cromossomos também afeta a estimativa do

número de cromossomos com base na fluorescência do SYBER Green I. Desta forma, é possível que o tamanho do genoma de CL Brener só possa ser conhecido após o seqüenciamento completo de seu genoma e o *assembly* dos dados.

De qualquer forma, os dados existentes sugerem que o tamanho do genoma dos isolados de *T. cruzi* I é menor do que de *T. cruzi* II. O aumento no número e tamanho dos cromossomos em isolados de *T. cruzi* II pode refletir um evento de especiação e suporta a relação distante entre os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (HENRIKSSON et al., 2002; BRIONES, et al., 1999). O maior genoma dos isolados híbridos do grupo de rDNA 1/2 poderia ser resultante de processos de hibridação e de recombinação entre genótipos distintos (SOUTO et al., 1996; STURM et al., 2003; STOLF et al., 2003). De fato, aneuploidia nestes isolados tem sido considerada como uma hipótese provável. O aumento do tamanho do genoma dos isolados de *T. cruzi* II e híbridos de rDNA 1/2 poderia refletir uma característica adaptativa relacionada a atribuições epidemiológicas desses isolados, os quais predominam em áreas onde a doença de Chagas é mais severa (ZINGALES et al., 1998).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a análise do cariótipo molecular de *Trypanosoma cruzi* levaram as seguintes conclusões:

1. A análise fenética baseada no polimorfismo de tamanho cromossômico e em dados de RFLP reconhece a existência dos três grupos analisados: *T. cruzi* I; *T. cruzi* II e um grupo de rDNA 1/2 (isolados híbridos).
2. O grupo de isolados híbridos é equidistante de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II sugerindo um mosaico de genótipos parentais.
3. A posição de CL Brener, o organismo de referência do Projeto Genoma, varia nos dendrogramas de acordo com as sondas analisadas. CL Brener pode agrupar com *T. cruzi* II ou com o grupo dos híbridos.
4. Os isolados de Zimodema 3 compartilham similaridades no nível do cariótipo molecular que permitem distingui-los dos isolados dos demais grupos.
5. CL Brener, Z3 e isolados do grupo rDNA 1/2 são progênies de eventos de recombinação distintos.
6. Também verificamos que isolados híbridos apresentam uma maior proporção de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes, os quais podem ter sido originados por recombinação e/ou amplificação de seqüências repetitivas.
7. Cromossomos são marcadores válidos para a identificação de grupos evolutivos
8. Os dois tipos de cistrons de rDNA têm uma distribuição diferencial nas bandas cromossômicas dos isolados do grupo de rDNA 1/2.
9. O número e o tamanho do genoma de *T. cruzi* podem ser estimados a partir da análise densitométrica dos dados de cariótipo molecular.
10. O cariótipo molecular é uma ferramenta valiosa para abordar o genoma de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS *

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1583 p.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S.l.], v. 215, p. 403-410, 1990.

AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1994. 326 p.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos, 2001. Cap. 14, p. 143-152.

ARRUDA, M. V.; REINACH, F. C.; COLLI, W.; ZINGALES, B. Sequence of the 24S α ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 40, p. 35-42, 1990.

AUGUSTO-PINTO, L.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; PENA, S. D. J.; MACHADO, C. R. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, Amsterdam, v. 272, p. 323-333, 2001.

BAÑULS, A. L.; DUJARDIN, J. C.; GUERRINI, F.; DONCKER, S.; JACQUET, D.; AREVALO, J.; NOËL, L. E.; RAY, D.; TIBAYRENC, M. Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. **Journal of Eukaryotic microbiology**, [S.l.], v. 47 pt.3, v. 197-207, 2000.

BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. **Parasitology**, London, v. 120, n. 5, p. 513-526, 2000.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARRETO, M. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. (eds.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 1979. p. 89-291.

BILLAUT-MULOT, O.; FERNANDEZ-GOMEZ, R.; LOYENS, M.; OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α : nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. **Gene**, London, v. 174, p. 19-26, 1996.

BLAINEAU, C.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 50, p. 197-204, 1992.

BOUCHÉ, J. P. The effect of spermidine on endonuclease inhibition by agarose contaminants. **Analytical biochemistry**, New York, v. 125, p. 42-45, 1981.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2000. p. 379-388.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2000. 431 p.

BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; BAÑULUS, A. L.; SIDIBÉ, I.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 92, p. 253-263, 1998.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 35-44, 2000.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p. 95-105, 2000.

BRITTO, C.; RAVEL, C.; BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGÈS, M.; DEDET, J. P.; WINCKER, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, London, v. 222, p. 107-117, 1998.

CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da Doença de Chagas pelo Benzonidazol. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 389-405.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome Project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 273-278, 1995.

CARRANZA, S.; GIRIBET, G.; RIBERA, C.; BUGUÑA, J.; RIUTORT, M. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladia). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, p. 824-832, 1996.

CASTELLANI O.; RIBEIRO L.V.; FERREIRA J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 14, p. 447-451, 1967.

CEVALLOS, A. M.; LÓPEZ-VILLASEÑOR, I.; ESPINOSA, N.; HERRERA, J.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and análisis of their transcripts. **Experimental Parasitology**, New York, v. 103, p. 27-34, 2003.

DANCHIN, A. The Delphic boat or what the genomic text tell us. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 14, p. 383, 1998.

DANCHIN, A.; HÉNAUT, A. The map of the cell is in the chromosome. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, [S.l.], v. 7, p. 852-854, 1997.

de SOUZA, W. O Parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DIAS-AÑEL, A. M.; ROSSI, M. S.; ESPINOSA, J. M.; GUIDA, C.; FREITAS, F. A.; KORNBLIHTT, A. R. mRNA encoding a putative RNA helicase of the DEAD-box family is up-regulated in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.l.], v. 47, p. 555-560, 2000.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigenic families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends Genet.**, [S.l.], v. 2, p. 159-165, 1986.

DUJARDIN, J. C.; BAÑULUS, A. L.; DUJARDIN, J. P.; AREVALO, J.; LE RAY, D. Comparison of chromosome and isoenzyme polymorphism in geographical populations of *Leishmania (Viannia) peruviana*. **Parasitology**, London, v. 117, p. 547-554, 1998.

DUJARDIN, J. C.; DUJARDIN, J. P.; TIBAYRENC, M.; TIMPERMAN, G.; DE DONCKER, S.; JACQUET, D.; AREVALO, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; GUERRA, H.; BERMUDEZ, H.; HAMERS, R.; LE RAY, D. Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. **Parasitology**, London, v. 110, p. 21-30, 1995.

DUJARDIN, J. C.; HENRIKSSON, J.; VICTOIR, K.; BRISSE, S.; GAMBOA, D.; AREVALO, J.; LÊ RAY, D. Genomic rearrangements in Trypanosomatids: an alternative to the “One gene” evolutionary hypotheses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 527-534, 2000.

DVORAK, J. A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S.l.], v. 24, p. 357-371, 1984.

ENGMAN, D. M.; REDDY, L. V.; DONELSON, J. E.; KIRCHHOFF L. V. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.22, n. 2-3, p. 115-123. 1987.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package)**, version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. Programa distribuído pelo o autor, 1995.

FERNANDES, O.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. C.; STURM, N. R.; NAIFF, R. D.; BARRET, T. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.95, p. 97-99, 2001

FERNANDES, O.; STURM, N.R.; DERRE, R.; CAMPBELL, D. A. The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 129-133, 1998.

FITCH, W. M.; MARGOLIASH, E. Construction of phylogenetic trees. A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. **Science**, Washington, v. 155, p. 279-284, 1967.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary biology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 763 p.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 42-47.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCO, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILLES, G. A. J.; ACOSTA, N.; ARIAS, A. R.; MILLES, M. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, London, v. 421, p. 936-939, 2003.

GIBSON, W. C.; MILES, M. A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 5, p.1299-1305, 1986.

GONZALES, A.; LERNER, T. J.; HUECAS, M.; SOSA-PINEDA, B.; NOGUEIRA, N.; LIZARDI, P. M. Apparente generation of a segment mRNA from two separate gene families in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 13, p. 5789-5804, 1985.

GRANDGENETT, P. M.; COUGHLIN, B. C.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 110, p. 409-415, 2000.

HENRIKSSON J, ASLUND L, MACINA RA, FRANKE DE CAZZULO BM, CAZZULO JJ, FRASCH AC, PETTERSSON U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 42, p. 213-223, 1990.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 108-114, 1996.

HENRIKSSON, J.; DUJARDIN, J. C.; BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIMPERMAN, G.; VENEGAS, J.; PETTERSSON, U.; TIBAYRENC, M.; SOLARI, A. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitology**, London, v. 124, p. 277-286, 2002.

HENRIKSSON, J.; PETTERSON, U.; SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi*: Correlation between Karyotype Variability and Isoenzyme Classification. **Experimental Parasitology**, New York, v. 77, p. 334-348, 1993.

HENRIKSSON, J.; PORCEL, B.; RYDAKER, M.; RUIZ, A.; SABAJ, V.; GALANTI, N.; CAZZULO, J.J.; FRASH, A. C. C.; PETTERSSON, U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam v. 73, p.63-74, 1995.

HERNANDEZ-RIVAS, R.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; ROMERO, M.;
HERNANDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure
and chromosomal organization. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p.
63-37, 1992.

HIGO, H.; YANAGI, T.; MATTA, V.; AGATSUMA, CRUZ-REYES, A.; UYEMA,
N.; MONROY, C.; KANBARA, H.; TADA, I. Genetic structure of *Trypanosoma*
cruzi in American continents: special emphasis on sexual reproduction in Central
America. **Parasitology**, London, v. 121, n. 4, p. 403-408, 2000

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and
phylogenetic inference. **Q. Ver. Biol**, [S.l.], v. 66, p. 411-453, 1991.

KAWASHITA, S. Y.; SANSON, G. F. O.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B.;
BRIONES, M. R. Maximum likelihood divergence date estimates based on rRNA
gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution.
Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 18, n.12, p. 2250-2259, 2001.

KENDALL, G.; WILDERSPIN, A. F.; ASHALL, F.; MILES, M. A.; KELLY, J.M.
Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not
conform to the 'hotspot' topogenic signal model. **The EMBO Journal**, Oxford, .v. 9,
n. 9, p. 2751-2758, 1990.

KILTIE, A. E.; RYAN, A. J. SYBER Green I staining of pulsed field agarose gels is
a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in
mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, p. 2946-2946, 1997.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: molecular
evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 17, p. 1244-1245,
2001.

LEWIN, B. **Genes VII**. 7 ed. Oxford : Oxford University Press, 2000. 990 p.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo
Trypanosoma cruzi. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M.
***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
p. 344-378.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 13, p. 7396-7401, 2001.

McCUTCHAN, T. F.; LI, J.; McCONKEY, G. A.; ROGERS, M. J.; WATERS, A. P. Cytoplasmatic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 11, p. 134-138, 1995.

MENDONÇA, M. B. A.; NEHEME, N. S.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFF, R. D.; BARRET, T. V.; COURA, J. R.; ZINGALES, B.; FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, London, v. 124, n. 2, p. 177-184, 2002.

MILES, M. A.; POVOA, M.; de SOUZA, A. A.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; KETTERIDGE, D. S. Chagas' disease in Amazon Basin II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 75, p. 667-674, 1981.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, London, v. 272, p. 819-821, 1978.

NAHUM, L. A. Evolução dos genomas In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos, 2001. Cap. 8, p. 82-96.

NUNES, L. R.; CARVALHO, M. R. C.; BUCK, G. A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader rRNA gene promoters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 86, p. 211-224, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.; PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 3776-3780, 1998.

PEARSON W. R.; LIPMAN D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 2444-2448, 1988.

PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p.79-90, 2003.

PIMENTA, J. R. **Análises filogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA**. 2002. 149p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.

PLAVICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. Free-Tree freeware program for construction of phylogenetics trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biol. (Praha)**, v. 45, p. 97-99, 1999.

POVOA, M. M.; DE SOUZA, A. A.; NAIFF, R. D.; ARIAS, J. R.; NAIFF, M. F.; BIANCARDI, C. B.; MILES, M. A. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 78, n. 5, p. 479-487, 1984.

RECHE P.; ARREBOLA R.; OLMO A.; SANTI D.V.; GONZALEZ-PACANOWSKA D.; RUIZ-PEREZ L. M. Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 247-258, 1994.

Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, set. 1999, vol 94 supl. 1, p. 429-432. ISSN 0074-0276.**

ROBELLO, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; ALAVAREZ-VALIN, F. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. **Gene**, Amsterdam, v. 246, p. 331-338, 2000.

** De acordo com: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 690: documentation – bibliographic references – content, form and structure. Geneva, 1987. 11 p.

ROHLPH, F. J. NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publishers, 1989.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 6, p. 514-525, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989.

SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Procedures of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; JUNQUEIRA, A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A.; FERNANDES, O. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 96, n. 8, p. 755-764, 2002.

SILVEIRA, A. S. Profilaxia. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 75-87.

SILVEIRA, A. S. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América – História de uma iniciativa internacional – 1991/2001. In: Silveira, A. S.; de Arias, A. R.; Segura, E.; Guillén, G.; Russomando, G.; Schenone, H.; Dias, J. C. P.; Padilla, J. V.; Lorca, M.; Salvatella, R. **O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América – História de uma iniciativa internacional – 1991/2001**. [S.l.], Organização Pan-americana de Saúde, 2002. Disponível em: <<http://www.paho.org/portuguese/ad/dpc/cd/dch-historia-incosur.PDF>>. Acesso em: 23 Jul. 2004.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **The principles of numeric taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1963.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 83, p. 141-152, 1996.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 45-52, 1993.

SPADILIERO, B.; NICOLINI, C.; MASCETTI, G.; HENRÍQUEZ, D.; VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: In situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S.l.], v. 85, p. 798-808, 2002b.

SPADILIERO, B.; SÁNCHEZ, F.; SLEZYNGER, T. C.; HENRÍQUEZ, D.A. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S.l.], v. 84, p. 835-839, 2002a.

STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 73-80, 2003.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**. Oxford, v. 33, n. 3, p. 269-279, 2003.

SULLIVAN, F. X.; WALSH, C. T. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 145-147, 1991.

TAYLOR, M. C.; MUHIA, D. K.; BAKER, D. A.; MONDRAGON, A.; SCHAAP, P.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase is encoded by a complex multigene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 205-217, 1999.

TDR STRATEGIC DIRECTION: CHAGAS DISEASE. FEV 2002. WHO – World Health Organization. Disponível em http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm#strategic_emphasis. Acesso em: 23 Jul 2004.

THOMPSON, J.; VAN SPAENDONK, R. M. L.; CHOUDHURI, R.; SINDEN, R. E.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P. Heterogeneous ribosome populations are present in *Plasmodium berghei* during development in its vector. **Molecular. Microbiology**, Oxford, v. 31, p. 253-260, 1999.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, London, v. 36, p. 47-115, 1995.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, [S.l.] v. 2, n. 1, out. 2003. Disponível em: <<http://www.kinetoplastids.com/content/2/1/12>>. Acesso em jul. 2004.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, Lancaster, v. 42, p. 277- 292, 1988.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitol.**, [S.l.], v. 18, p. 405-410, 2002.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F. J. Genetic Characterization of Six Parasitic Protozoa: Parity Between Random- Primer DNA Typing and Multilocus Enzyme Electrophoresis **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p.1335–1339, 1993.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 115 – 119, 1986.

TOMAZI, L. **Filogenias moleculares e análise do polimorfismo de *Trypanosoma cruzi* sugerem hibridização introgressiva nos subgrupos rDNA 1/2 e Zimodema 3.** 2004. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2004.

ÜRMEYİ, T. P.; BONALDO, M. F.; SOARES, M. B.; RONDINELLI, E. Construction of a normalized cDNA library for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.l], v. 46, p. 542-544, 1999.

VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, A. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam v. 138, n. 1, p.131-141, 2004.

WELLENS, T. E.; WALLIKER, D.; SMITH, C. L. A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic across of *Plasmodium falciparum*. **Cell**, Cambridge, v. 49, p. 633-642, 1987.

WHO - World Health Organ. Control of Chagas disease. WHO Expert Committee. **Tech. Rep. Ser. v. 905**: i-vi, 1-109, 2002.

WILSON, A. C.; SARICH, V. M.; MAXSON, L. R. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 71, p. 3028-3030, 1974.

ZINGALES, B.; RONDINELLI, E.; DEGRAVE, W.; SILVEIRA, J. F.; LEVIN, M.; PASLIER, D. L.; MODABBER, F.; DOBROKHOTOV, B.; SWINDLE, J.; KELLY, J. M.; ASLUND, L.; HOHEISEL, J. D.; RUIZ, A. M.; CAZZULO, J. J.; PETERSSON, U.; FRASCH, A. C. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 16-22, 1997a.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E. S.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. U.; NEHME, N. S.; OLIVEIRA SOUTO, R. P.; MACEDO, A. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener – The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 811 – 814, 1997b.

ZINGALES, B.; PEREIRA, E. S.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. U.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, Z.; MACEDO, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Tropica**, Basel, v. 68, p. 159 – 173, 1997c

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JASEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini exon gene sequences. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 105 – 112, 1998.

BIBLIOGRAFIA*

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1583 p.

AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1994. 326 p.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

DICIONÁRIO Aurélio Eletrônico - Século XXI. Versão 3.0. [S.I.], Nova Fronteira, Lexikon Informática Ltda., 1999. 1 CD-ROM.

DICIONÁRIO Eletrônico Houaiss da língua portuguesa. Versão 1.0. [S.I.], Objetiva Ltda., FL Gama Design Ltda., 2001. 1 CD-ROM.

LEWIN, B. **Genes VII**. 7 ed. Oxford : Oxford University Press, 2000. 990 p.

MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Holos, 2001. 202 p.

MATTAR, F. N.; FOWLER, F. R.; TAVARES, M. C.; PIEREN, R. W. Redação de documentos acadêmicos – conteúdo e forma. **Caderno de Pesquisas em administração**, São Paulo, v.1, n. 3, 2º Sem./1996.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron,books 1996. 524 p. (vol. 1); 517 p. (vol. 2).

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de Rotas na Tecnologia do Gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema integrado de Bibliotecas. Centro de computação de São Carlos. **Diretrizes para apresentação de teses e dissertações à USP:** documento eletrônico ou impresso. São Paulo: SIBi/USP, 2001. 16 p.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP:** documentos eletrônicos ou impressos. São Paulo: SIBi/USP, 2003. 98 p.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP:** documento eletrônico e impresso. São Paulo: SIBi/USP, 2004. 110 p.

ANEXOS

ANEXO A

**PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma*
cruzi hybrid stocks based on chromosomal size variation**

Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation

Aurélio Pedroso^a, Elisa Cupolillo^b, Bianca Zingales^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 748, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 11 December 2002; received in revised form 12 March 2003; accepted 18 March 2003

Abstract

Although all classical lines of evidence point to the fact that *Trypanosoma cruzi* has a predominantly clonal evolution, accumulating data show that some *T. cruzi* stocks are the result of hybridisation events. We evaluated whether chromosomal polymorphism would give evolutionary information on hybrid isolates. Twenty-three coding sequences were mapped on the chromosomes of nine parasite stocks, four of which are putative hybrids (CL Brener and rDNA group 1/2). Phenetic analyses of karyotype data were based on the absolute chromosomal size difference index (aCSDI), a method that assumes that the genomic distance between two organisms is the sum of the size differences between their homologous chromosomes. aCSDI-based dendrograms obtained from a variable number of probes (3–18 probes) defined in all the cases three clusters: two corresponding, respectively, to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups; and a third one, to rDNA group 1/2. CL Brener was alternatively positioned in *T. cruzi* II or rDNA group 1/2 clusters. Three clusters were also observed in the dendrogram constructed with restriction fragment length polymorphism (RFLP) data from 18 probes. The topology of the chromosome and RFLP dendrograms is similar, with a significant correlation coefficient ($r = 0.86062$; $P < 0.0001$), supporting a strong structuring of the clusters. This study also revealed that hybrid stocks have a larger proportion of two different-sized homologous chromosomes, as compared with non-hybrid strains. Overall, our results show that chromosomes are valuable characters for identification of evolutionary groups, in particular, *T. cruzi* hybrid organisms.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Molecular karyotype; RFLP; Phenetic analyses; Hybrid stocks

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease, shows considerable genetic polymorphism. This has been demonstrated by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) [1,2]; restriction fragment length polymorphism (RFLP) of kinetoplast DNA [3]; DNA fingerprinting [4] and random amplified polymorphic DNA (RAPD) [2,5]. Evidence based on linkage disequilibrium has shown that *T. cruzi* has a clonal population structure with rare exchanges of genetic material between isolates [2].

T. cruzi clonal genotypes appear to cluster into two major phylogenetic lineages as inferred from MLEE and RAPD data [1,6] and polymorphism of ribosomal RNA (rRNA) and mini-exon genes [6,7]. A standardised classification of the major divisions within *T. cruzi* was established by an expert committee and the two lineages were named as *T. cruzi* I and *T. cruzi* II [8]. The committee has also recommended that the classification of isolates typed as Zymodeme 3 [1], rDNA group 1/2 [6] and isoenzyme group 39 [9] should await further studies [8].

Subsequent MLEE and RAPD analyses of a larger sample of *T. cruzi* isolates demonstrated the distinction of five lower phylogenetic subdivisions within *T. cruzi* II (IIa–IIe) [10]. In that study CL Brener, the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project [11], has been clustered in sub-group IIe; isolates of rDNA group 1/2 and isoenzyme clone 39, in sub-group IIId; and isolates of Zymodeme 3, in sub-groups IIa and IIc [10].

Despite the prevalence of clonal evolution in *T. cruzi* [2,12], convergent lines of evidence, including multilocus

Abbreviations: aCSDI, absolute chromosomal size difference index; eEF1, elongation factor 1; ESTs, expression sequence tags; MLEE, multilocus enzyme electrophoresis; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; RAPD, random amplified polymorphic DNA; rDNA, ribosomal DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3091-3810x217; fax: +55-11-3815-5579.

E-mail address: zingales@iq.usp.br (B. Zingales).

markers [10,13–15], analysis of rRNA genes [6,7] and incongruence between nuclear and mitochondrial gene genealogies [16] indicate that some *T. cruzi* stocks present heterozygotic genotypes for some loci. Among these putative hybrid stocks, CL Brener and rDNA group 1/2 isolates are included [6,15,16]. We have previously shown that group 1/2 isolates have two types of rRNA cistrons, corresponding, respectively to rDNA units of *T. cruzi* I and *T. cruzi* II [6]. Recently, we provided evidence that in these isolates the two rDNA units are segregated in different chromosomal bands, suggesting recombination between the two *T. cruzi* major groups [17].

Early studies based on flow cytometric analysis of mithramycin-stained parasites showed variation up to 40% of total DNA content among *T. cruzi* stocks [18]. After subtraction of the kinetoplast DNA, the genome size of *T. cruzi* would be about 100–200 Mb (reviewed in [19]). CL Brener haploid genome, estimated as 43 Mb, is distributed in approximately 20 chromosomal bands, sized from 0.45 to 3.5 Mb [20,21]. Extensive chromosome size polymorphism has been revealed in *T. cruzi* isolates by improved conditions of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (reviewed in [21]). It has been shown that most chromosomes appear in pairs of presumably homologous chromosomes, which in many cases differ in size. Chromosome polymorphism is a general characteristic of trypanosomatids and has been attributed mainly to expansion/contraction of tandem repeats [22]. In addition, chromosome fusion/fission events, although less frequent, have been clearly demonstrated in Old World and New World *Leishmania* genomes [23].

Analysis of chromosome size variation has been used for measuring distances between two species of *Leishmania* [22]. This approach is based on the diploid hypothesis for trypanosomatid genomes and infers that chromosome size polymorphism is reflecting gene rearrangements. Accordingly, it assumes that the larger the size difference between

homologous chromosomes from different stocks, the more divergent the stocks are. For this analysis, the authors developed a phenetic method that employs the absolute chromosomal size difference index (aCSDI), in which the genomic distance between two organisms is the sum of the absolute size differences between their homologous chromosomes [22]. The aCSDI was applied to *Leishmania* populations for building evolutionary hypotheses at intraspecific [22,24] and genus [25] levels.

Recently, the aCSDI progressive model was applied to the analysis of *T. cruzi* stocks [26]. The resultant dendrogram is in agreement with the clustering of *T. cruzi* into two major groups and in five small sub-divisions within *T. cruzi* II [26].

In the present study, we aimed at evaluating whether chromosome size polymorphism would give evolutionary information on *T. cruzi* hybrid isolates. In this direction, we have mapped 23 probes on chromosomes of putative hybrid and non-hybrid strains: four of these isolates are representative of heterozygotic genotypes (CL Brener and rDNA group 1/2); three, of *T. cruzi* I and two, of *T. cruzi* II groups. These genetic markers cover almost all CL Brener chromosomes ranging from 600 to 3300 kb. The relationships among the stocks were calculated by the aCSDI formula for the analysis of chromosomal size variation [22] and compared with those obtained from RFLP data originated from the hybridisation of genomic DNA with the same probes. Both phenetic analyses identified three clusters and putative hybrid strains were grouped in one of these clusters.

2. Materials and methods

2.1. Stocks

Nine stocks previously characterised were considered in this study (Table 1). Procedures for parasite cultivation

Table 1
Characteristics of *T. cruzi* stocks

Stocks ^a	Host	Origin	Major groups ^b	Sub-groups ^c	Isoenzyme groups ^d	rDNA groups ^e	Mini-exon groups ^e	Hybrid stocks
CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	II	Ile	ND	1	1	+ ^{f,g}
Esmeraldo cl3	Human	Brazil	II	IIb	30	1	1	–
Y	Human	Brazil	II	ND	ND	1	1	ND
NR cl3	Human	Chile	ND	IId	39	1/2	1	+ ^{e,f}
SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivia	ND	IId	39	1/2	1	+ ^{e,f}
SC43 cl1	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivia	ND	IId	39	2	1	+ ^{e,f}
Dm28c	<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	I	ND	ND	2	2	ND
Silvio X10 cl1	Human	Brazil	I	I	17	2	2	–
YuYu	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	I	ND	ND	2	2	ND

ND, not determined.

^a All stocks except Y and YuYu are cloned populations.

^b According to [8].

^c According to [10].

^d According to [9].

^e According to [6].

^f According to [16].

^g According to [15].

Table 2
Estimated sizes of hybridising chromosomes^a

Probes ^b	CL Brener	Esmeraldo	Y	NR cl3	SO3 cl5	SC43 cl1	Dm28c	Silvio X10	YuYu
EST 330	955	1280	960	1335	1350	1145	1435	1600	1870
AA556080	790	865	960	940	940	980	1180	1600	670
EST 335	1950	1690	2015	2380	2380	2425	1830	1735	1490
AA556083	1950	1475	1720	1970	1990	2000	1830	1735	1310
EST 368	3375	3340	3330	3310	3310	3280	2550	2120	2620
AA556093	3375	3340	2920	3060	3060	3060	2550	2120	2200
EST 448	1390	1630	1300	770	730	730	550	520	620
AA556122	650	1630	1300	660	620	650	550	520	495
EST 449	1000	1140	1030	1175	1120	1130	1315	1360	1385
AA556123	1000	1140	1030	1175	1120	1130	1315	1360	1385
EST 462	1070	1095	1110	1160	1160	1160	1310	1360	1450
AA532107	990	1095	990	1160	1160	1160	1310	1360	1315
EST 479	3015	1680	1620	3030	3030	3000	1340	1290	1560
AA556136	2815	1310	1450	3030	3030	3000	1200	1290	1370
	1320		1210	1600	1620	1520			1270
	1200		1210	1340	1340	1320			1180
EST 549	1430	1430	1430	1410	1430	1475	1410	1430	1430
AA676030	1430	1430	1430	1410	1430	1475	1410	1430	1430
EST 552	2160	1840	1830	2970	2970	2970	1585	1490	1420
AA676033	1710	1540	1830	2130	2130	2230	1250	1490	1420
EST 580	1060	600	630	1070	1060	1100	650	700	660
AA676059	670	600	630	690	690	725	650	700	660
EST 582	1110	740	615	1180	1200	1260	560	590	610
AA676060	610	670	615	1000	1020	1070	490	590	565
EST 593	1040	1120	1300	1710	1710	1710	1370	1470	1560
AA676068	855	1000	1115	1170	1170	1200	590	1020	1370
			1030	1030	1030	1040		660	960
			850	810	810	850			630
EST 613	680	680	670	720	730	760	680	580	500
AA676083	680	680	670	720	730	760	680	580	500
EST 629 ^c									
AA676097	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EST 638	1640	1720	1600	1650	1670	1630	1790	1780	1780
AA676103	1450	1570	1290	1650	1670	1630	1790	1600	1600
	650	4590	4590	750	740	770	630	560	675
									560
EST 654	700	700	695	700	700	720	610	650	570
AA676109	700	700	640	700	700	720	610	650	570
EST 686	640	665	640	670	670	715	620	620	570
AA676135	640	665	640	670	670	715	620	620	570
EST 712	720	780	670	720	670	680	570	600	520
AA676152	720	780	670	720	670	680	570	600	520
RNA helicase	2750	1170	1045	2020	2020	2020	1225	1435	1330
AF067953	830	980	600	1700	1720	1770	1125	1150	1080
rDNA 24S α	1350	1770	1840	1500	1500	1640	1900	1575	1525
M28885	1350	1475	1140	1100	1100	1080	1600	1380	
							1200		
Actin 2	2350	1490	1270	770	800	780	580	575	690
U20234	685	1490	1270	670	685	685	580	575	550
eEF1	1770	1960	2030	1210	1210	1270	990	875	790
L76077	1180	850	1670	1210	1210	1270	990	875	720
rDNA 5S	1730	1780	1700	1710	1665	1680	1360	1440	1510
M59503	1510	1780	1700	1110	1060	1130	1360	1440	1360

ND, not determined.

^a Numbers refer to estimated chromosome size in kb.

^b The accession number of the probes is indicated; ESTs are derived from a normalized cDNA library of CL Brener epimastigotes and the official designation is TENE.

^c Repetitive sequence distributed in many chromosomal bands.

and preparation for PFGE have been described elsewhere [6,20].

2.2. Molecular karyotyping, probes and hybridisation

Chromosome-sized DNA of *T. cruzi* isolates was separated by PFGE in Gene Navigator apparatus (Pharmacia) under conditions previously described [20]. The gel was stained with ethidium bromide and DNA was transferred to Zeta Probe membranes (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Several blots were produced. In this work, 23 probes were employed. Eighteen expression sequence tags (ESTs) obtained from a normalised cDNA library of CL Brener epimastigotes and cloned in pT3T7 18D modified vector (Pharmacia) [27] were randomly chosen from our EST collection. The designation of the ESTs and their accession number are indicated in Table 2. The DNA inserts were PCR amplified with T3 and T7 primers and purified after electrophoresis in 1% agarose gels. Five cloned *T. cruzi* genes were also used as probes (accession numbers indicated in Table 2): the 24S α rRNA gene [28]; the *SalI/HindIII* fragment of the RNA helicase gene [29]; full genes encoding actin 2 and the α subunit of the elongation factor 1 (eEF1), and the 5S rDNA coding and intergenic region. The DNA inserts were released with appropriate restriction enzymes, gel purified and labelled with (α 32 P) d-ATP using the Random Primer Extension Labelling System (BRL). The blots were hybridised under conditions previously described [20] and washed to final stringency of $1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS at 60°C . Blots were exposed to X-ray films with intensifying screens at -80°C . After removal of the probe and exposure of the membrane to guarantee the efficiency of the stripping process, the same blot was hybridised with different probes. In addition, hybridisation of the same probe was performed on different blots. This allowed evaluation of the reproducibility of size estimation of the hybridising chromosomes and definition of a threshold of 75 kb of significance of measured differences.

2.3. Southern blot of genomic DNA

Epimastigote DNA was obtained as previously described [30]. Genomic DNA (4–6 μg) was digested with *Pst* I, run on 0.8% agarose gels and transferred to Zeta Probe membranes. Hybridisation with labelled probes and washing conditions were as described before.

2.4. Numerical analysis

The sizes of the hybridising chromosomes were estimated from a calibration curve using molecular size standards represented by chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* (GIBCO) and of CL Brener [20]. The central, most dense part of the hybridising spot was considered for calculation. Size differences between homologous chromosomes were calculated pair-wisely employing the aCSDI formula

[22]: $\text{aCSDI}(ab) = \sum_i (|L_{ai} - L_{bi}| + |S_{ai} - S_{bi}|)$, where L and S stand for the size of the largest and the smallest chromosome recognised by probe i in isolates a and b , respectively. Hierarchical agglomeration of the distances was performed using the UPGMA algorithm, employing the MEGA version 2.1 [31]. RFLP profiles were analysed assuming the characters as binary codes, scoring the bands as present or absent. The binary matrix was transformed in a distance matrix using the Jaccard's coefficient [32] and the UPGMA algorithm was used to obtain the dendrogram employing the NTSYS package [33]. The bootstrap test was performed using 1000 replicates employing the FreeTree software [34].

3. Results

3.1. Molecular karyotype of *T. cruzi* stocks

Ethidium bromide staining of chromosomal DNA separated by PFGE showed that *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 stocks have bands of larger molecular size (up to 3.5 Mb) as compared to *T. cruzi* I (up to 2.8 Mb) (Fig. 1A). Eighteen ESTs of CL Brener (Table 2) were ^{32}P -labelled and hybridised with the chromosome blots. The hybridisation pattern of 14 of these probes is shown in Fig. 1B. The blots were also hybridised with five *T. cruzi* cloned genes (data not shown). Data in Table 2 indicated that the 23 probes hybridised with most chromosomal bands of CL Brener ranging from 600 kb (chromosomal band II [20]) to 3375 kb (chromosomal band XIX [20]). The overall analysis of the hybridisation data with the nine stocks indicated that: (i) all markers revealed different hybridisation patterns; (ii) solely EST 549 (1/23; 4.3%) hybridised with a single band of very similar molecular size in all the stocks; (iii) EST 629 (1/23; 4.3%) corresponds to a highly repetitive sequence distributed in many chromosomal bands in all the stocks; (iv) the individual hybridisation pattern of 22 probes with two stocks of rDNA group 1/2 and SC43 c11 was very conserved; (v) 11 probes: ESTs 368; 448; 552; 582; 613; 654; 686; 712; and sequences corresponding to 5S rRNA; actin 2; and eEF1 genes (11/23; 48%) hybridised in larger chromosomes in strains of *T. cruzi* II and of rDNA group 1/2 as compared to *T. cruzi* I; (vi) three ESTs: 330; 449; 462 (3/23; 13%) presented the inverse situation.

3.2. Chromosomal size polymorphism

Three ESTs (479; 593; 638, Fig. 1B) and the 24S α rRNA gene (data not shown) hybridised with more than two bands in some putative hybrid and non-hybrid stocks. This pattern could be due to: (i) aneuploidy; (ii) the presence of pseudogenes; (iii) hybridisation with a transposable element; (iv) the existence of gene copies in heterologous chromosomes; (v) heterogeneity of the parasite population. To investigate these possibilities, a search for similarity ($E < e^{-10}$)

Fig. 1. Molecular karyotype of *T. cruzi* stocks. Chromosomal DNA was separated by PFGE and stained with ethidium bromide (A). After transfer to Zeta Probe membranes, the blots were hybridised with 32 P-labelled probes derived from ESTs (specified below each blot) (B). The positions of the isolates in the lanes of each gel are indicated in panel A. Molecular size markers (in kb) on the left.

in databases with BlastX program indicated that EST 479 shows high similarity with *T. cruzi* adenylyl cyclase. This enzyme is encoded by a multigene family, distributed in six chromosomes of CL Brener [35]. EST 593 shows high similarity with *T. cruzi* GP63-2 glycoprotein, also encoded by several genes [36]. In this case, the distribution of the genes in the chromosomal bands has not been determined. EST 638 has not been characterised in *T. cruzi*. Finally, the presence of a 24S α rRNA pseudogene has been reported in the *T. cruzi* Y strain [28].

Some probes gave double hybridising bands (Fig. 1B), which have been interpreted as two different size-variants of a pair of gene-bearing homologues [21]. The number of different-sized homologous chromosomes hybridising with 18 probes was determined, as well as their size variation (Fig. 2). The greater variation in the number and size of the homologous chromosomes was observed in two isolates of rDNA group, SC43 cl1 and in CL Brener (10/18; 55% of the probes) followed by YuYu stock (8/18; 44%). In putative non-hybrid strains, the percentage of different-sized homologues was lower (5–28% of the probes). In hybrid strains, the most representative size variation between homologous chromosomes was between 75 and 475 kb (Fig. 2).

3.3. RFLP analysis

The distribution of the 18 above-mentioned probes in the genomic DNA of the stocks was analysed by Southern blotting. The pattern obtained for six of these probes is shown in Fig. 3. It was observed that the sizes of restriction fragments to which hybridised four probes (ESTs 462; 552; 613; and RNA helicase (4/18; 22.2%)) are specific for each of the three groups: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II and putative hybrids (rDNA group 1/2 and CL Brener) (see as examples the pat-

terns of ESTs 462; 552; and RNA helicase in Fig. 3). Interestingly, the hybridisation pattern obtained for each of the eight probes: ESTs 448; 449; 462; 552; 580; 613; 686; and RNA helicase (8/18; 44.4%) was conserved with restricted DNA of CL Brener and group 1/2 stocks. In these cases, two or three hybridisation fragments were identified suggesting heterozygosity of these stocks at least for some loci (as examples see the patterns of ESTs 448; 462; 552, 686; and RNA helicase in Fig. 3). However, only two probes (EST 462 and RNA helicase (2/18; 11%)) showed for the heterozygotic stocks an intermediate profile between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II (Fig. 3).

3.4. Phenetic analyses

The estimated size differences of hybridising chromosomes with 18 probes were used to perform phenetic analysis of the stocks under the progressive model (aCSDI). Because the aCSDI algorithm is based on the examination of homologous chromosomes under a diploid hypothesis, ESTs 479; 593; 638; 629; and 24S α rDNA were not included in the analysis. The distance matrix (in kb) was obtained applying the aCSDI to each pair of isolates (Table 3, data in the upper triangular matrix). This matrix was transformed in a dendrogram by the UPGMA algorithm (Fig. 4A). Three groups of strains were recognised (see below).

Correlation analysis between phenetic distances calculated from chromosome and RFLP data was undertaken. Therefore, the matrix with the pair-wise Jaccard's distance for RFLP analysis was determined (Table 3, data in the lower triangular matrix) and used to construct the dendrogram by the UPGMA algorithm (Fig. 4B). The topology of the RFLP dendrogram was supported by high bootstrap values (Fig. 4B).

Fig. 2. Polymorphism of homologous chromosomes in *T. cruzi* stocks. The number of different-sized homologous chromosomes is indicated in the ordinate. The size differences of homologous chromosomes hybridising with 18 probes were divided into five categories (values in kb) (insert panel). Data were compiled from Table 2.

Fig. 3. Southern blot analysis. Genomic DNA was digested with *Pst* I and resolved in 0.8% agarose gels. After transference to Zeta Probe membranes, the samples were hybridised with the indicated labelled probes. Molecular size markers (in kb) are indicated on the left.

aCSDI and RFLP dendrograms revealed the presence of three clusters that show high similarity at “group” level (excepting CL Brener), but not within the groups (Fig. 4A and B). Groups A and E included isolates classified as *T. cruzi* II, whereas group C, clustered the three isolates of

T. cruzi I. Group B included rDNA group 1/2 and SC43 isolates (aCSDI dendrogram in Fig. 4A) and group D clustered group B isolates and CL Brener (Fig. 4B). Therefore, group D represents putative heterozygotic genotypes (see Table 1).

Table 3
Distance matrix array

	CL Brener	Esmeraldo	Y	NR	SO3	SC43	Dm28c	Silvio	YuYu
CL Brener		8692	8030	8738	8897	9314	12734	14268	14883
Esmeraldo	0.442		5335	11949	12203	12850	11209	12671	12460
Y	0.434	0.150		11198	11166	11469	10650	12498	13113
NR	0.231	0.373	0.333		590	1436	10390	12043	12977
SO3	0.231	0.404	0.365	0.042		1226	10473	12065	13000
SC43	0.231	0.404	0.365	0.042	0		11318	12893	13931
Dm28c	0.500	0.500	0.520	0.491	0.518	0.518		3476	4708
Silvio	0.569	0.520	0.538	0.534	0.534	0.534	0.318		4326
YuYu	0.518	0.520	0.538	0.509	0.509	0.509	0.279	0.233	

Upper triangular matrix: aCSDI from molecular karyotype data (values in kb). Lower triangular matrix: Jaccard's distance from RFLP data.

Fig. 4. Phenetic dendrograms constructed with the UPGMA method with aCSDI (A) and RFLP (B) data from 18 hybridising probes. (C) Average distances between groups (lower triangle) and within groups (diagonal) obtained from aCSDI and RFLP data. Groups A, B and C are defined in panel A; groups C, D and E, defined in panel B. Numbers at the branches in panel B are bootstrap values (1000 replicates). Distances are indicated in the scales.

To investigate the robustness of the clusters defined by the aCSDI and RFLP markers, the average distances between and within the groups were determined with the MEGA 2.1 program (Fig. 4C). The data indicated that group B (rDNA group 1/2) was very homogeneous, presenting the lowest intra-group distance (1084 kb). On the other hand, group A (*T. cruzi* II + CL Brener) was the most heterogeneous with the highest intra-group average distance (6441 kb). Group C (*T. cruzi* I) presented an intermediate value (4170 kb). The values of the average distances between the groups were not significantly different, corroborating the existence of the three groups. The same conclusions were obtained from the average distances calculated with RFLP data. In this case also, group D, which clustered putative hybrid isolates (CL Brener + rDNA group 1/2), had the lowest intra-group average distance (0.128) and presented a dissimilarity of 0.39 with group E (*T. cruzi* II) and 0.524 with group C (*T. cruzi* I).

The identification of three clusters by aCSDI and RFLP analyses is at variance with the previously reported dendrograms obtained from karyotype, MLEE and RAPD data, where only the two major *T. cruzi* groups are evidenced [26]. It should be pointed out that five of the nine isolates here investigated (CL Brener; Silvio X10 cl1; Esmeraldo cl3; NR cl3; and SC43 cl1) were included in the sample analysed by those authors [26].

The aCSDI analysis of Henriksson et al. [26] employed six probes located on CL Brener chromosomes ranging from 590 to 1710 kb. To investigate whether the source of discrepancy between the dendrograms was due to the number

of the probes and/or the sizes of the hybridising chromosomes, we have compiled aCSDI data selecting among our probes those that hybridised with CL Brener chromosomal bands from 600 to 1710 kb (see Table 2). Twelve probes met this requisite. Two dendrograms were constructed with six probes each, chosen according to their ascending numerical order (Table 2) (Fig. 5A and B). An additional dendrogram was determined with six probes mapping on 640–1060 kb chromosomes (Fig. 5C). Further simulations were done with variable number of probes (3–18 probes) (data not shown). In all the cases, three major clusters were identified corresponding to those shown in Fig. 4A. High congruence was found in the taxa inside groups, excepting that CL Brener shifted between *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 clusters. On the other hand, topological differences between groups and inside the major groups were observed (Fig. 5 and data not shown).

4. Discussion

In this study, the chromosome size polymorphism of *T. cruzi* isolates was employed to infer evolutionary hypotheses on putative hybrid stocks. For this purpose, we have mapped on the chromosomal bands of 9 isolates (7 cloned strains), 18 ESTs of CL Brener and 5 cloned genes. The 23 sequences are distributed in 18 of the 20 chromosomal bands of CL Brener and, therefore, represent useful markers for sequencing of individual chromosomes. In addition, chromosome mapping

(A) – Probes: ESTs 330; 448; 449; 462; 549; 580 (600 – 1,710 kb)

(B) – Probes: ESTs 582; 613; 654; 686; 712; 5S rDNA (600 – 1,710 kb)

(C) – Probes: ESTs 330; 580; 613; 654; 686; 712 (500 – 1,060 kb)

Fig. 5. Phenetic dendrograms constructed with the UPGMA method with aCSDI values from six probes mapping on CL Brener chromosomes from 600 to 1710 kb (A and B) and 640 to 1060 kb (C). The designation of the probes is specified in each panel. The scales indicate the aCSDI distance in kb.

in nine isolates suggests that the sequences do not constitute any linkage group (Table 2). Regular PFGE analysis during a 6-year period demonstrated that the molecular karyotypes of the isolates were stable in prolonged culture.

The ethidium bromide staining and the hybridisation patterns (Fig. 1 and Table 2) indicated that isolates of *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 present an increase of the molecular size of several chromosomes as compared with *T. cruzi* I strains. This observation is in agreement with previous conclusions based on karyotype analysis of 25 stocks and has been interpreted as a speciation event, that supports the distant relationship between the two major *T. cruzi* groups [21]. Additionally, it may suggest that the genome size of *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 would be larger than that of *T. cruzi* I. Karyotype analysis of a larger sample of stocks will be necessary for a definitive conclusion.

The dendrogram derived from aCSDI data from 18 probes defined three clusters that correspond to *T. cruzi* I, *T. cruzi* II

and a group represented by rDNA group 1/2 and SC43 cl1 strains (Fig. 4A). Interestingly, we have shown that SC43 cl1 is a variant of rDNA group 1/2 genotype, which has lost type 1 rDNA units [6]. Therefore, the dendrogram obtained with chromosomal data supports the taxonomic proximity of these strains, which were classified as isoenzyme type 39 [9] and sub-group IIId by RAPD and MLEE analyses [10]. In the aCSDI dendrogram obtained with 18 probes CL Brener clustered in *T. cruzi* II branch. The three groups were robust independently of the number of analysed probes (between 3 and 18), except that in some cases CL Brener shifted between *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 clusters (see Fig. 5). On the other hand, topological differences inside the groups were observed in the diverse dendrograms. Taken together these observations indicate that aCSDI analysis is a valuable approach to define taxonomic “groups”, however it does not allow to make inferences regarding the relationships among taxa in each group.

The flipping of CL Brener between *T. cruzi* II and rDNA group 1/2 suggests that CL Brener shares characters with the two clusters. It also may be taken as an indication that CL Brener and group 1/2 isolates may have arisen from different processes of genetic exchange. Several evidences support this hypothesis. Based on nuclear gene genealogies it has been proposed that these two groups of strains are divergent and may be the result of one or more hybridisation events between strains of distant clades [16]. Based on the presence of types I and II rDNA units in group 1/2 strains, but not in CL Brener, we have proposed that group 1/2 isolates are resultant from genetic exchange between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II [6,17]. Nucleotide polymorphisms of the intergenic region of the 1F8 gene [37] allowed the design of probes that correlated with the *T. cruzi* I/II classification [38]. Hybridisation of 1F8 oligonucleotide probes to different chromosome bands of rDNA group 1/2 and CL Brener indicated a segregation of the nucleotide polymorphism with distinct chromosomes and is consistent with genetic exchange of part or all of a chromosome [38]. In addition, hybrid genotypes were obtained experimentally by co-infection of cultured mammalian cells with two *T. cruzi* clones. Evidence has been presented of genetic exchange, fusion of parental genotypes and homologous recombination in the hybrid genotypes [39].

Three clusters were also observed in the dendrogram constructed with RFLP data (Fig. 4A and B). Phenetic distances calculated from chromosome and RFLP patterns showed to be significantly correlated, with a high correlation coefficient ($r = 0.86062$ and $P < 0.0001$) determined by the Mantel test [40]. This implies that rearrangements responsible for the chromosome size polymorphism here observed and point mutations associated with RFLP are evolutionarily correlated. Such congruence between genomic and genetic characters reinforces the strong structuring of the three clusters. Phylogenetic analyses based on nucleotide sequences [16,41] and microsatellite markers [42] have also shown the existence of three or four clades in *T. cruzi*.

An intriguing observation of this work is that hybrid strains showed a larger proportion of two different size-variants of a pair of gene-bearing homologues, as compared with non-hybrid strains (Fig. 2). An exception would be the YuYu stock (*T. cruzi* I), which also presented several different-sized homologous chromosomes. Nevertheless, observations from our laboratory indicate that this isolate is a mixture of parasite populations (unpublished data), which could be responsible for chromosomal polymorphism. Inspection of Fig. 2 indicates different patterns of size variation of homologous chromosomes in CL Brener and group 1/2 strains, giving further support to the diverse evolutive origin of these genotypes. Recently, we have provided evidence that stocks of Zymodeme 3 are hybrid lines [38]. The analysis of the karyotype of some of these stocks is under way to verify the sizes of their homologous chromosomes.

The increased size of homologous chromosomes could have been caused by homologous recombination between chromosomes or by amplification of repetitive sequences

(revised in [25]). Fusion/fission events, although less frequent in trypanosomatids, could be responsible for the most significant size-differences, as reported in *Leishmania* [23]. Additional mechanisms such as genetic exchange, proposed in *Leishmania* species [43] and recently evidenced in hybrid *T. cruzi* clones [39], as well as pseudo-sexual processes, like mitotic non-disjunction [44] may contribute to chromosomal size polymorphism. We are tempted to speculate that genetic exchange has contributed to the size variation observed in the homologous chromosomes of *T. cruzi* hybrid isolates. The characterisation of the DNA sequences involved in the chromosomal size variations will be necessary for an understanding of these mechanisms. In addition, DNA sequence comparisons of selected *loci* from representative chromosome bands and isolates will give indications to the relationship among parental and hybrid strains (work in progress).

A significant point that should be considered is that the hybrids might not represent a mere F1 offspring and, in this case, various combinations of parental characters are expected. In addition, most probably, we are not analysing the actual parents, but rather, genotypes that are closely related to them. Moreover, the hybridisation event could be ancient and the hybrids could have propagated clonally and accumulated divergent mutations. The observed distances among the three groups (*T. cruzi* I, *T. cruzi* II and hybrids) based on data of chromosomal size variation with 18 probes and the low frequency of heterozygotic profile observed by the RFLP analysis (Fig. 3) reinforce the latter hypothesis and suggest that each group has evolved independently.

Although all classical lines of evidence point to the fact that *T. cruzi* has a predominantly clonal evolution [12], convergent and accumulating data show that some *T. cruzi* groups are the result of hybridisation events. Therefore, genetic exchange must have played an important role in the generation of parasite diversity. Our results show that chromosomes are valuable characters for identification of evolutionary groups, in particular, *T. cruzi* hybrid organisms. It is anticipated that the gene content and its arrangement in the chromosomes may have implications in the biological properties of *T. cruzi* strains.

Acknowledgements

EST clones were kindly provided by Dr. Wim Degraeve and Dr. Adeilton Brandão (FIOCRUZ—Rio de Janeiro). Clones containing *T. cruzi* actin 2 and elongation factor 1 (eEF1) full genes were kindly provided by Dr. Marcelo Briones (EPM/UNIFESP). A clone containing *T. cruzi* 5S rRNA gene and the intergenic region was kindly provided by Dr. David Campbell (UCLA). We are indebted to Dr. D. Campbell for critical reading of the manuscript and insightful suggestions. We thank Marcelo Nunes Silva for technical assistance. This work was supported by grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq). A.P. is a graduate fellow from CNPq.

References

- [1] Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978;272:819–21.
- [2] Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclinal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:293–6.
- [3] Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonucleases fingerprinting of kinetoplast DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6810–4.
- [4] Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SDJ. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 1992;55:147–54.
- [5] Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala F. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1335–9.
- [6] 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.
- [7] Kawashita SY, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS. Maximum likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* 2001;18:2250–9.
- [8] Anon. Recommendations from an International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:429–32.
- [9] Tibayrenc M, Ayala F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988;42:277–92.
- [10] Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;30:35–44.
- [11] Zingales B, Pereira ES, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, et al. *Trypanosoma cruzi* Genome Project: biological characteristics and molecular typing of Clone CL Brener. *Acta Trop* 1997;68:159–73.
- [12] Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 2002;18:405–10.
- [13] Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop* 1996;61:31–40.
- [14] 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.
- [15] Brisse S, Barnabé C, Bañuls A-L, Sidibé I, Noël S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:253–63.
- [16] 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.
- [17] Stolf BS, Souto RP, Pedrosa A, Zingales B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126:73–80.
- [18] Dvorak JA, Hall TE, Crane MSJ, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 1982;29:430–7.
- [19] Santos MRM, Cano MI, Schijman A, Lorenzi H, Vazquez M, Levin MJ, et al. The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:859–62.
- [20] Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 1995;71:273–8.
- [21] Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996;12:108–14.
- [22] Dujardin JC, Dujardin JP, Tibayrenc M, Timperman G, De Doncker S, Jacquet D, et al. Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. *Parasitology* 1995;110:21–30.
- [23] Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pages M, Dedet J-P, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 1998;222:107–17.
- [24] Dujardin JC, Bañuls AL, Dujardin JP, Arevalo J, Le Ray D. Comparison of chromosome and isoenzyme polymorphism in geographical populations of *Leishmania (Viannia) peruviana*. *Parasitology* 1998;117:547–54.
- [25] Dujardin JC, Henriksson J, Victor K, Brisse S, Gamboa D, Arevalo J, et al. Genomic rearrangements in *Trypanosomatids*: an alternative to the “one gene” evolutionary hypothesis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:527–34.
- [26] Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, et al. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology* 2002;124:277–86.
- [27] Ürményi TP, Bonaldo MF, Soares MB, Rondinelli E. Construction of a normalized cDNA library for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:542–4.
- [28] Arruda MV, Reinach FC, Colli W, Zingales B. Sequence of the 24S rRNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;40:35–42.
- [29] Diaz-Añel AM, Rossi MS, Espinosa JM, Guida C, Freitas FA, Kornblihtt AR, et al. mRNA encoding a putative RNA helicase of the DEAD-box family is up-regulated in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 2000;47:555–60.
- [30] Medina-Acosta G, Cross GAM. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple ‘mini-prep’ procedure. *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:327–30.
- [31] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244–5.
- [32] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc V Sci Nat* 1908;44:223–70.
- [33] Rohlf FJ. NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publishers; 1989.
- [34] Pavlicek A, Hrdá S, Flegr J. Free-Tree freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Praha)* 1999;45:97–9.
- [35] Taylor MC, Muhia DK, Baker DA, Mondragon A, Schaap P, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase is encoded by a complex multigene family. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:205–17.
- [36] Grandgenett PM, Coughlin BC, Kirchhoff LV, Donelson JE. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:409–15.
- [37] Gonzalez A, Lerner TJ, Huecas M, Sosa-Pineda B, Nogueira N, Lizardi PM. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate gene families of *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 1985;13:5789–804.

- [38] 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.
- [39] Gaunt WG, Yeo M, Frame AF, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 2003;421:936–9.
- [40] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalised regression approach. Cancer Res 1967;27:290–320.
- [41] Robello C, Gamarro F, Castanys S, Alvarez-Valin F. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. Gene 2000;246:331–3.
- [42] Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AIR, Chiari E, Zingales B, et al. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96:407–13.
- [43] Blaineau C, Bastien P, Pagès M. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. Mol Biochem Parasitol 1992;50:197–204.
- [44] Bañuls AL, Dujardin JC, Guerrini F, Doncker S, Jacquet D, Arevalo J, et al. Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. J Eukaryot Microbiol 2000;47:197–207.

ANEXO B

STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains

Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains[☆]

Beatriz S. Stolf¹, Ricardo P. Souto², Aurélio Pedroso, Bianca Zingales*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 748, CEP 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 3 July 2002; received in revised form 7 October 2002; accepted 14 October 2002

Abstract

Trypanosoma cruzi isolates can be divided into two major phylogenetic lineages—*T. cruzi* I and *T. cruzi* II. The population structure is predominantly clonal, with sexuality having no or limited influence on the evolution of the parasite. Isoenzymes and nuclear gene sequences have provided evidence that some *T. cruzi* strains are hybrids. Previous work of our group has shown that the putative hybrid strains designated as group 1/2 contain two types of rDNA units, corresponding to those found in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. In this study, the presence and transcription of the two types of ribosomal RNA (rRNA) cistrons were investigated in epimastigotes, metacyclic and tissue culture trypomastigotes of group 1/2 isolates. PCR and RT-PCR assays indicate that both types of cistrons are present in group 1/2 strains, but only type-2 genes are transcribed in all developmental stages. The structure of the promoter regions of group 1/2 was compared to reference *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains. In all cases, the transcription start point was mapped to a conserved A residue located approximately 1800 bp upstream the 18S rRNA gene. The distribution of rDNA clusters in chromosomal bands of group 1/2 was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The majority of type-2 rDNA genes are localized in a 1.5 Mbp band, whereas type-1 cistrons are mostly concentrated in a 1.1 Mbp band. The structural and functional studies of group 1/2 ribosomal cistrons described here may shed light on the evolutionary processes that took place during the generation of such hybrid organisms.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Ribosomal cistrons; Transcription; Hybrid strains

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease and of major medical significance in Latin America. The parasite life cycle alternates between vertebrates and triatomids, with different developmental stages in each host: epimastigotes and metacyclic trypomastigotes in the insect vector and intracellular amastigotes and bloodstream try-

pomastigotes in the mammalian host. *T. cruzi* is diploid, its reproduction is predominantly asexual and, therefore, its strains represent independent clonal lineages [1].

Ribosomal RNA (rRNA) genes have been valuable in the investigation of the genetic diversity of *T. cruzi* strains [2–6]. In trypanosomatids, the large subunit (LSU) rRNA is larger than the typical eukaryotic rRNA species [7] and is fragmented into two high molecular mass (24S α and 24S β) and six low molecular mass (S₁–S₆) RNA species [8,9]. In *T. cruzi* there are approximately 110 copies of tandemly repeated rDNA transcription units [10]. Sequence determination of the 24S α rRNA gene of *T. cruzi* strains revealed dimorphism in the D7 divergent domain [11]. In fact, polymerase chain reaction (PCR) amplification of this domain produced three patterns defining three groups of strains [2]. In strains classified as rDNA group 1, a 125-bp product was obtained; in strains of rDNA group 2, a 110-bp amplicon was produced; and both D7-derived amplicons (125 and 110 bp) were observed in strains designated as rDNA group 1/2 [2]. Sequence analysis indicated 98–100% identity within

Abbreviations: PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; rDNA, ribosomal DNA; RT, reverse transcription; tsp, transcription start point

[☆]Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession numbers AF451731, AF451732 and AF451733.

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3091-3810x217; fax: +55-11-3815-5579.

E-mail address: zingales@iq.usp.br (B. Zingales).

¹ Present address: Instituto Ludwig, Rua Prof. Antonio Prudente 109, CEP 01509-010 São Paulo, SP, Brazil.

² Present address: Faculdade de Medicina da Fundação ABC, Av. Príncipe de Gales 821, CEP 09060-650 Santo André, SP, Brazil.

125- or 110-bp amplicons, whereas 80% similarity was observed between sequences of the two types of amplicons [2,11].

Further characterization of the mini-exon intergenic region and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis allowed the definition of two major phylogenetic lineages in *T. cruzi*: lineage 1, which comprises rDNA group 1 and group 1/2 strains and lineage 2, corresponding to rDNA group 2 [2]. The division into two major groups was also observed by isoenzyme analysis [12], ribotyping patterns [3], restriction fragment length polymorphism of ribosomal internal transcribed spacers [4], rRNA promoter activity [13,14] and phylogenetic analysis of the 18S rRNA gene [5,15].

In 1999, the nomenclature of the two lineages was standardized as *T. cruzi* I and *T. cruzi* II by an expert committee [16]. *T. cruzi* I strains correspond to the previously defined isoenzyme group Z1 [18], lineage 2/rDNA group 2 [2] and group 1 [12]. *T. cruzi* II strains, which correspond to isoenzyme Z2 [18], rDNA group 1 [2] and group 2 [12], are related to the domestic cycle and have been isolated from human chronic infections mainly in endemic areas of Chile, Bolivia and Brazil [15,17,19,20]. Recently, immunological evidence has been provided supporting the hypothesis that human infection in the Southern Cone countries is due to *T. cruzi* II strains [21]. The committee recommended that the phylogenetic position of strains of isoenzyme group Z3 [22], isoenzyme type 39 [1] and rDNA group 1/2 [2] should be defined later, after additional investigation [16].

rDNA group 1/2 stocks correspond to isoenzyme type 39 [1] and have been isolated from chagasic individuals, triatomine insects and domestic mammals over a broad geographical area [1,2,19,20]. RAPD analysis, isoenzyme patterns and mini-exon intergenic sequence have allocated group 1/2 isolates in *T. cruzi* II [2,23]. Southern blot analysis of genomic DNA revealed that group 1/2 isolates possess two types of rDNA units that correspond, respectively, to those found in rDNA group 1 and group 2 isolates [2]. Hybridization with a 24Sα rDNA probe suggested that each type of rDNA unit should be organized in a different array of repeats and that type-2 rDNA genes are 8–10-fold greater in copy number compared to type-1 genes [2]. Recently, the hybrid nature of isoenzyme type 39 has been reinforced based on nucleotide sequence analysis of dihydrofolate reductase-thymidilate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes [24].

Due to the interesting epidemiological and genetic characteristics of rDNA group 1/2, in this work, we have analyzed the two types of ribosomal cistrons of these organisms and characterized the promoter region, expression of rRNA species and their chromosomal distribution, comparing them with isolates from rDNA groups 1 and 2. Two major findings are reported here: the observation that only one type of ribosomal cistron is transcribed in group 1/2 strains; and the separation of the two types of cistrons in different chromosomal bands.

2. Materials and methods

2.1. *T. cruzi* stocks and nucleic acids isolation

Epimastigote forms of the stocks whose characteristics are listed in Table 1 were grown in liver infusion tryptose (LIT) medium. Metacyclic trypomastigotes of the NR cl3 clone were obtained after incubation of epimastigotes in LIT medium plus 20% (v/v) Grace's insect medium (Sigma) for 7–10 days and purification on DEAE-cellulose columns [25]. Purification of metacyclics was determined by conventional microscopy and was higher than 95%. Tissue culture trypomastigotes were obtained from infection of LLC-MK₂ cell monolayers [26]. Epimastigote DNA was obtained as previously described [27]. RNA was prepared from 2×10^8 to 5×10^8 parasites using the guanidine-acid phenol method [28].

2.2. DNA and RNA amplification

The amplification of the D7 divergent domain of the 24Sα rRNA gene from genomic DNA and total RNA was done using primers D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') and D72 (5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3') as previously described [11]. Ribosomal promoter regions were obtained by PCR amplification of genomic DNA employing primers Fw1 (5'-TTAGGATCTTTAATTTTCTC-3') and RevA (5'-AAAAAGAACACGTTGATTCC-3') for type-1 genes and Fw2A (5'-TCGCAAAATGTCATGC-3') and RevA for type-2 genes (see Fig. 1B). After 4 min at 94 °C, samples were submitted to 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and were incubated for 7 min at 72 °C. Reaction products were run on 7.5% polyacrylamide gels and stained with ethidium bromide. Transcription of type-1 and -2 promoter sequences was verified by RT-PCR. Reverse transcription was performed at 42 °C for 30 min with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT, USB) (see conditions in [11]), employing RevA oligonucleotide. PCR amplification and electrophoresis was done as described above. Amplification of type-2 promoter region of group 1/2 strains was performed with Fw2B (5'-TCGAATTTTGGGTACCCCT-3') and RevA primers. PCR steps were the same as above, except that annealing temperature was 63 °C instead of 55 °C. The PCR products were purified with Magic PCR Preps

Table 1
Characteristics of *T. cruzi* stocks

Stocks ^a	Host	Origin	Lineage ^b	Group ^c
CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	1	1
NR cl3	Human-chronic phase	Chile	1	1/2
SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivia	1	1/2
Dm 28	<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	2	2

^a All stocks, except Dm 28, are cloned populations.

^b Typed by mini-exon and RAPD [2].

^c Typed by PCR amplification of the D7 domain [2].

Fig. 1. Ethidium bromide-stained amplification DNA products. Molecular sizes in bp on the left. (A) RT-PCR amplification of the D7 domain of 24S α rRNA of *T. cruzi* isolates. Developmental stages: epimastigotes (e); metacyclic trypomastigotes (m) and tissue culture trypomastigotes (tct). PCR amplification of genomic DNA. (B) Schematic representation of the promoter regions of CL and Dm 28 strains (not to scale), including positions and specificities of the oligonucleotides used in this study. The position of transcription start points previously mapped for CL (●) [30] and La Cruz (▼) [32] strains and mapped in this work (★) are indicated. (C) PCR amplification of the promoter region of the rRNA cistron with Fw1/RevA primers (lane 1) and Fw2A/RevA (lane 2) of genomic DNA of epimastigotes. (D) RT-PCR amplification of the 5' end of pre-rRNA of epimastigotes with Fw1/RevA primers (lane 1) and Fw2A/RevA (lane 2).

(Promega), repaired with Klenow enzyme and cloned into *EcoRV* site of pBluescript.

2.3. Cloning of Dm 28 promoter region

Forty micrograms of genomic DNA of the Dm 28 strain was partially digested with *Sau3AI*. Fragments (15–20 kb) were purified in a 10–40% sucrose gradient and inserted in λ DASH[®] II (Stratagene) digested with *Bam*HI and *Xho*I. In vitro packaging was performed as described [29]. Recombinants were selected by hybridization with the 18S rDNA probe (pTc18S probe [30]). Purified DNA from four clones was spotted onto nylon membranes and hybridized with 18S, 24S α and 24S β rDNA probes [9]. A subclone with an insert of 4.4 kb was obtained in pBluescript following digestion with *Sac*I and *Pst*I. Restriction map analysis of the clones and subcloning was done by standard procedures [29].

2.4. Primer extension reaction

The synthetic oligonucleotides RevA or RevB (5'-CGAT-ACGGCGATGCGAAACAAAAGACC-3') (Fig. 1B) were labeled at the 5' end with 200 μ Ci of [γ ³²P] rATP (7000 Ci mmol⁻¹, Amersham) and T4 polynucleotide kinase (Amersham). Each primer was hybridized with 5–10 μ g of total epimastigote RNA by incubation at 80 °C for 3 min

and 37 °C for 1 h. Reaction proceeded at 37 °C for 30 min after addition of first strand buffer, 0.5 mM dNTP, 10 mM DTT and 40 U of Superscript-RT (GIBCO). Further extension was obtained by addition of dNTP to 0.1 mM and 40 U of Superscript-RT and incubation at 37 °C for 1 h. Reaction products were loaded on 6% polyacrylamide–8 M urea gels (BioRad), along with sequencing reactions of plasmid constructs with the corresponding promoter regions using the same primer employed for primer extension.

2.5. Separation of chromosomal bands

Chromosome-sized DNA of *T. cruzi* isolates was separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in Gene Navigator apparatus (Pharmacia) under conditions previously described [31]. Chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* (GIBCO) were used as molecular mass standards. The gel was stained with ethidium bromide and DNA was transferred to zeta-probe membranes (BioRad). The blot was hybridized with: 24S α rDNA probe—G101p10 [9]; D7 domain-group 1 (125-bp sequence); and D7 domain-group 2 (110-bp sequence), labeled using the Random Primer Extension Labeling System (BRL). Hybridization and washing conditions were as described [31]. Blots were washed to a final stringency of 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS at 55 °C and exposed to X-ray films, with intensifying screens at –80 °C.

To achieve a better resolution of the chromosomal DNA of SO3 cl5 comprised between 1.6 and 1.1 Mbp, homogeneous pulses of 350 s for 90 h at 84 V at 9 °C in the Gene Navigator apparatus were employed. The gel was stained with ethidium bromide and 1.5 mm agarose slices between 1.6 and 1.0 Mbp markers were excised and washed several times with TE. Fragments of 1 cm were cut from each excised slice, diluted with 5 volumes of TE, heated at 100 °C for 5 min and chilled in ice. An aliquot of 15 µl was submitted to PCR with D71/D72 primers. Products were analyzed in polyacrylamide gels.

2.6. Sequencing

Sequencing reactions were performed with T7 sequencing Kit (Pharmacia). Gel preparation and electrophoresis were done in SequiGen BioRad gel system.

3. Results

3.1. Expression of 24Sα rRNA genes

The expression of the two types of 24Sα rRNA genes in developmental stages of group 1/2 isolates was investigated by RT-PCR amplification of the D7 region and compared with that of representative strains of rDNA groups 1 and 2 (Fig. 1A). In CL Brener epimastigotes, the 125-bp band characteristic of group 1 was observed. A product of 110 bp characteristic of group 2 was observed in epimastigotes of Dm 28 and of group 1/2 isolates (SO3 cl5 and NR cl3). Metacyclic and tissue culture trypomastigotes of NR cl3 also produced only the 110-bp product. PCR amplification of genomic DNA of NR cl3, CL Brener and Dm 28 with D71 and D72 primers (Fig. 1A) showed that both bands of 125 and 110 bp are present in NR cl3, and that the concentration of the 110-bp product is higher than that of the 125-bp fragment, as previously reported [2]. The DNA products derived from RT-PCR and PCR assays were transferred to nylon membranes and hybridized with the 125-bp probe of CL Brener (D7-1), as previously described [11]. This probe hybridized only with the 125-bp bands obtained by amplification of DNA and RNA from CL Brener and genomic DNA from NR cl3 (data not shown). Several RT-PCR conditions were assayed and in none of them was a 125-bp product obtained for group 1/2 isolates.

3.2. Cloning and sequencing of the promoter region of Dm 28 (group 2)

The promoter region of the ribosomal cistron from CL strain (group 1), previously cloned and sequenced [30], was used in this work. The sequence of La Cruz strain (group 2) promoter [32] was used for comparison. The rDNA promoter from Dm 28 strain, a representative of group 2, was isolated from a genomic library of 15–20 kb fragments in

λDASHII (Stratagene). The selected clone had an insert of 16.6 kb, which contained approximately 11 kb of the region upstream of the 18S rRNA gene, the complete 18S gene and 3.2 kb downstream of this gene (S3 gene and the 5' end of the 24Sα rDNA). A subclone containing the complete 18S gene (2.2 kb) and 2.1 kb of the external transcribed spacer (ETS) was obtained. The 5' end of this subclone, comprising a region of approximately 800 bp located between *Sac*II and *Hinc*II sites and that included the transcription start points (tsp) previously reported for CL [30] and La Cruz [32] strains was sequenced (GenBank AF451731) and aligned with CL (GenBank M31432) and La Cruz (GenBank M88712) sequences. There was 97.9% identity between Dm 28 and La Cruz sequences, and only 82% between any of them and CL.

3.3. Promoter regions and transcription of the ribosomal cistron

Analysis of the promoter sequences allowed the design of oligonucleotides for PCR/RT-PCR amplification and mapping of tsp. The localization of these primers is indicated in Fig. 1B. The presence of type-1 and -2 ribosomal promoter regions in group 1/2 clones was investigated by two independent amplification reactions of genomic DNA with the pairs of oligonucleotides Fw1/RevA (type-1 specific) and Fw2A/RevA (type-2 specific). The data in Fig. 1C show type-1 products (370 bp, lane 1) in CL Brener, NR cl3 and SO3 cl5, but not in Dm 28 strain. Type-2 amplification products (170 bp, lane 2) were obtained in Dm 28, NR cl3 and SO3 cl5. These results indicate the presence of both type-1 and -2 promoter regions in isolates of group 1/2 (NR cl3 and SO3 cl5). In addition, they confirm that primers Fw1 and Fw2A are group specific.

The transcription of ribosomal precursors from both types of promoters was evaluated by RT-PCR. Amplification of CL Brener RNA with primers Fw1/RevA produced a 370-bp fragment (Fig. 1D). This result was unexpected considering the previously mapped tsp in CL strain [30] (Fig. 1B). However, additional data confirm the localization of the tsp of CL Brener upstream of CL tsp (Fig. 1B). In contrast with CL Brener, no product was obtained for the other strains with Fw1/RevA primers. On the other hand, primers Fw2A/RevA amplified a 170-bp product in Dm 28 and in the two isolates of group 1/2 (Fig. 1D). These results confirm that in this group of strains only type-2 ribosomal cistrons are transcribed, corroborating the results obtained for the expression of the 24Sα rRNA gene (Fig. 1A).

Type-2 promoter regions were PCR amplified with primers Fw2B/RevA from genomic DNA of NR cl3 and SO3 cl5 originating 540-bp fragments that were cloned. These constructs, together with those bearing CL [30] and Dm 28 promoters were used to determine the sequence surrounding the tsp. Primer extension products around 450 nt were obtained in all the reactions using RevA primer (data not shown), suggesting that transcription might start near

Fig. 2. (A) Identification of the tsp of the ribosomal cistron by primer extension. Reaction products were electrophoresed in a polyacrylamide–urea gel (lane 1) along with the corresponding sequencing reaction primed on single strand DNA template with the same oligonucleotide (lanes T, C, G, and A). (B) Alignment of the sequences (130 bp) flanking the rRNA promoter tsp (A in bold letter with asterisk) determined in this study for CL Brener, Dm 28, NR cl3 (type-2 GenBank AF451732) and SO3 cl5 (type-2 GenBank AF451733) and sequences of NR cl3 (type-1) and SO3 cl5 (type-2) previously determined (#) [14], and of La Cruz strain [32]. (C) Percent identity between promoter regions (130 bp).

the upstream tsp determined for La Cruz strain [32] (see Fig. 1B). Primer extension reactions using oligonucleotide RevB generated products of approximately 110 nt for all isolates (Fig. 2A). Comparison of the aligned sequences of 130 bp regions comprising the tsp indicates that in all strains the tsp is the nucleotide A in a TCAT sequence approximately 1800 bp distant from the beginning of the 18S gene.

The promoter sequences determined in the present study for CL Brener, NR cl3 (type-2), SO3 cl5 (type-2) and Dm 28 were aligned with the promoter sequences already reported for La Cruz [32], NR cl3 and SO3 cl5 [14] (Fig. 2B). We performed pair-wise comparisons on 130 bp flanking the tsp of the isolates. The data shown in Fig. 2C allow us to conclude that Nunes et al. [14] have cloned the type-1 promoter from NR cl3 and type-2 promoter from SO3 cl5. This is not

unexpected since in that study the authors cloned the promoter regions after PCR reactions using primers that do not discriminate type-1 or -2 sequences.

3.4. Chromosomal localization

Chromosomal DNA of four isolates was separated by PFGE and transferred to zeta-probe membranes. Strips were independently hybridized with the 24S α rDNA probe; and with probes containing the D7 domains of CL Brener (D7-1) and Dm 28 (D7-2) (Fig. 3A). Different-sized chromosomal bands hybridized with the 24S α probe: a single 1.35-Mbp band in CL Brener; two bands of 1.5 and 1.1 Mbp in NR cl3 and SO3 cl5 isolates; and three bands of 1.9; 1.6 and 1.2 Mbp in Dm 28 (Fig. 3A). Identical hybridization pattern was obtained for the four isolates with 18S rDNA probe (data not shown), indicating physical linkage between the two probes and suggesting the presence of complete rDNA cistrons in the chromosomal bands. A probe containing the D7 domain of group 1 (D7-1) hybridized with CL Brener chromosome, and the two chromosomal bands of group 1/2 isolates. On the other hand, the probe containing group 2-D7 domain (D7-2) hybridized with Dm 28 chromosomes and the 1.5 Mbp band of group 1/2 strains (Fig. 3A).

(A) – Southern blot

(B) - PCR

Fig. 3. Separation of chromosomal DNA of *T. cruzi* isolates and mapping of the ribosomal RNA cistrons. (A) Hybridization with 24S α rDNA; group 1-D7 domain (D7-1); and group 2-D7 domain (D7-2) probes. The autoradiography of the membranes hybridized with D7-1 probe was exposed for longer time. (B) Ethidium-stained polyacrylamide gel for the analysis of PCR amplification of the D7 domain of SO3 cl5 with primers D71/D72. Lanes: no DNA; genomic DNA; DNA extracted from the excised chromosomal bands (estimated sizes in Mbp) of the preparative PFGE.

The distribution of type-1 and -2 rRNA genes was analyzed in chromosomal bands of SO3 cl5. Twelve agarose gel slices containing chromosomal bands ranging from 1.0 to 1.6 Mbp were excised and the extracted DNA was submitted to amplification of D7 domain (Fig. 3B). An intensely stained product of 110 bp, characteristic of type-2 cistron, is observed in the 1.5 Mbp slice along with a faint 125-bp product. This result corroborates the hybridization data obtained with D7-2 and D7-1 probes with 1.5 Mbp chromosomal DNA of group 1/2 isolates (Fig. 3A). Faint 110-bp amplification products were obtained in several chromosomal fractions of lower molecular mass, possibly due to the degradation of high molecular mass DNA and spreading during the electrophoretic run. On the other hand, an intensely stained type-1 product of 125 bp is observed in the 1.1-Mbp slice. In this fraction, the 110-bp band is also observed. The data suggest that in SO3 cl5 type-2 rDNA genes are concentrated in the 1.5-Mbp band, whereas type-1 rRNA cistrons would be mostly segregated in the 1.1-Mbp band, possibly along with some copies of type-2 genes.

4. Discussion

Ribosomal RNA species are generally transcribed from a family of related genes that appear to be nearly identical within a given organism [33]. Although gene homogenization of the rDNA units by concerted evolution [34] appears to be the rule, intragenomic polymorphism of rRNA genes has been reported. Among protozoa, *Plasmodium* parasites have an unusual rDNA organization. The rRNA genes are few in number, between four and eight rDNA units [35], dispersed throughout the genome [36] and their transcription is developmentally regulated [37,38]. As we showed in this study, this seems not to be the case for the two types of rDNA gene units in *T. cruzi* group 1/2. In these organisms only type-2 rDNA copies are transcribed in different developmental stages (epimastigotes, metacyclic and tissue culture trypomastigotes). This suggests that type-1 cistrons are silent genes. An analogous situation, where only one of the two types of 18S rRNA genes is transcribed in both sexual and asexual populations of the platyhelminth *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* has been reported [39]. Although it is considered that epimastigotes and metacyclic trypomastigotes obtained in laboratory are equivalent to the stages found in the triatomine vectors, and that tissue culture trypomastigotes correspond to the blood form of the mammalian host, the possibility that type-1 rDNA is expressed by parasites in the digestive tract of the triatomids or by intracellular amastigotes cannot be ruled out.

The tsp of type-2 cistron of NR cl3 and SO3 cl5, as well as the tsp of CL Brener and Dm 28 were mapped 1800 nt from the beginning of the 18S rDNA. The conservation of tsp localization may reflect functional constraints in the transcription process. Our data agree with the position of the main

tsp previously mapped in La Cruz strain at 1768 nt upstream from the 18S rRNA coding sequence [32]. In this strain, an alternative tsp was located 270 bp downstream of the main tsp [32], corresponding to the position of the tsp mapped in the CL strain [30]. In our assays, we did not find in CL Brener this alternative tsp. The presence of a RT-PCR band in CL Brener using Fw1/RevA primers (Fig. 1D) corroborates the usage of the 5' tsp mapped in this study by primer extension (Fig. 2), since Fw1 primer anneals upstream from the tsp previously described for CL (see Fig. 1B). The different results obtained for CL [30] and CL Brener could be due to genetic diversity between the two parasite stocks, to microheterogeneity in the copies of the rDNA cistrons or to the source of reverse transcriptases used in the studies (Superscript RT versus M-MLV RT). In fact, the two enzymes have different extension properties, RNase H activities and abilities to proceed through hypothetical secondary structures.

Our group and others have shown that plasmid constructs bearing the rDNA promoter region of CL strain efficiently drive the expression of bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) when transfected in group-1 isolates, but not in group-2 [13,14]. In contrast, constructs bearing group-2 rDNA promoter are active in strains of both groups [14]. In group 1/2 strains it has been shown that group-1 promoter displays weak activity, whereas group-2 promoter is fully active [14] (and unpublished observations of our group). These data support the observations that only type-2 cistrons of group 1/2 stocks are transcribed and suggest that transcription factors, in addition to the sequence of the promoter region, play a relevant role in defining levels of the rRNA promoter activity.

In this study, we have provided evidence that the two types of rDNA cistrons have a differential distribution in chromosomal bands of group 1/2 strains. It was verified that the majority of type-2 rDNA genes are localized in the 1.5 Mbp band, whereas type-1 cistrons are mostly concentrated in the 1.1 Mbp band. The arrangement of the two types of rDNA genes may suggest that type-1 genes are placed in a chromosomal context that makes their transcription difficult or null. However, the chromosomal context would not explain the weak transcription activity of CAT reporter gene in group 1/2 strains transfected with plasmid constructs bearing type-1 promoter [14] (and unpublished observations of our group). In this case, the lack of specific transcription factors seems to be a more convincing explanation.

Recently, the hybrid nature of the genome of isoenzyme group 39 has been proposed based on the sequence of two nuclear single-copy genes—DHFR-TS and TR [24]. It has been shown that group 39 strains, as well as CL Brener, are heterozygous for the two genes and are homoplasmic for a region of the mitochondrial genome. Phylogenetic analyses based on the sequence of the two genes, as well as RAPD and isoenzyme data have allocated group 39 strains and CL Brener into different subclusters of *T. cruzi* II [23,24]. In our studies, we have not found two types of rDNA units in CL Brener, supporting the notion that this isolate may have a

different genetic origin from group 1/2 strains. In view of the results presented here, it will be of interest to verify whether both copies of DHFR-TS and TR genes are transcribed in group 39 isolates.

Some hypotheses could explain the origin of group 1/2 isolates: (a) the present data and sequence data of some regions of the rDNA cistron [2,5] suggest genetic exchange between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II; (b) based on sequences of DHFR-TS and TR genes, Machado and Ayala [24] concluded that the hybrid strains are the result of hybridization events between strains from Clades B and C—both *T. cruzi* II; (c) duplication and mutation of genes. This latter hypothesis seems less probable considering the accumulating evidence for the hybrid nature of the genome of group 1/2. Whichever hypothesis describes the origin of group 1/2 strains, the present distribution of type-1 and -2 cistrons could be explained by evolution mechanisms that operate in multigene families [34].

Genotyping of *T. cruzi* strains indicates that group 1/2 stocks have a broad geographic distribution [1,2,19,20], suggesting that hybrid genomes are stable in time and space. In addition, epidemiological studies have shown that group 1/2 stocks are pathogenic to humans, with high prevalence in endemic areas of Bolivia [19] and Chile [20].

The study of group 1/2 strains may contribute to words unraveling the mechanisms that took place in the evolution of *T. cruzi* by clonal propagation and genetic exchange as well as in the definition of molecular markers for pathogenic lineages.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. David Campbell and Dr. AnaMaria Stolf for critical reading of the manuscript and insightful suggestions. We thank Dr. Lucille Floeter-Winter for the ribosomal promoter and the 18S rRNA probe of CL strain. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). A.P. is a graduate fellow from CNPq.

References

- [1] Tibayrenc M, Ayala F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988;42:277–92.
- [2] 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.
- [3] Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA. On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. *Parasitology* 1998;117:243–7.
- [4] Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, et al. Population heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:195–7.

- [5] Kawashita SY, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS. Maximum likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol E* 2001;18:2250–9.
- [6] Mendonça MBA, Nehme NS, Santos SS, et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* Zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 2002;124:177–84.
- [7] White TC, Rudenko G, Borst P. Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to Domain VII of other eukaryotic 28S rRNA. *Nucl Acids Res* 1986;14:9471–89.
- [8] Campbell DA, Kubo K, Clark CG, Boothroyd JC. Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. *J Mol Biol* 1987;196:113–24.
- [9] Arruda MV, Reinach FC, Colli W, Zingales B. Sequence of the 24Sα rRNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;40:35–42.
- [10] Castro C, Hernández R, Castañeda M. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol* 1980;2:229–33.
- [11] 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.
- [12] Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 1995;36:48–115.
- [13] Floeter-Winter LM, Souto RP, Stolf BS, Zingales B, Buck GA. Can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker of speciation? *Exp Parasitol* 1997;86:232–4.
- [14] Nunes LR, Carvalho MRC, Buck GA. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol* 1997;86:211–24.
- [15] Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:219–32.
- [16] Satellite-Meeting. Recommendations from an International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, 11–16 April 1999, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:429–32.
- [17] Zingales B, Souto RP, Mangia RH, et al. Molecular epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 1998;28:105–12.
- [18] Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;71:217–25.
- [19] Breniere SF, Bosseno M-F, Telleria J, et al. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. *Exp Parasitol* 1998;89:285–95.
- [20] Solari A, Campillay R, Ortiz S, Wallace A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 2001;97:226–33.
- [21] Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch ACC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* 2002;195:401–13.
- [22] Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:221–37.
- [23] Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;30:35–44.
- [24] 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.
- [25] De Souza MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by DEAE cellulose columns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983;78:317–33.
- [26] Zingales B, Katzin AM, Arruda MV, Colli W. Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* 1985;16:21–34.
- [27] Medina-Acosta G, Cross GAM. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:327–30.
- [28] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [29] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning—a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY; 1989.
- [30] Dietrich P, Soares MB, Affonso MHT, Floeter-Winter LM. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 1993;125:103–7.
- [31] Cano MI, Gruber A, Vazquez M, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome Project. *Mol Biochem Parasitol* 1995;71:273–8.
- [32] Martínez-Calvillo S, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 1994;142:243–7.
- [33] Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Ver Biol* 1991;66:411–53.
- [34] Dover GA. Molecular drive in multigenic families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 1986;2:159–65.
- [35] McCutchan TF, Li J, McConkey GA, Rogers MJ, Waters AP. Cytoplasmic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. *Parasitol Today* 1995;11:134–8.
- [36] Welles TE, Walliker D, Smith CL, et al. A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 1987;49:633–42.
- [37] Gunderson JH, Sogin ML, Wollett G, et al. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* 1987;238:933–7.
- [38] Thompson J, van Spaendonk RML, Choudhuri R, Sinden RE, Janse CJ, Waters AP. Heterogeneous ribosome populations are present in *Plasmodium berghei* during development in its vector. *Mol Microbiol* 1999;31:253–60.
- [39] Carranza S, Giribet G, Ribera C, Buguñá J, Riutort M. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladia). *Mol Biol E* 1996;13:824–32.

ANEXO C

**VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, A. Chromosomal polymorphism,
gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups**

Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups

Nancy Vargas, Aurélio Pedroso, Bianca Zingales*

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 748–CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

Received 24 June 2004; received in revised form 5 August 2004; accepted 15 August 2004

Abstract

Pulsed-field gel electrophoresis and DNA hybridization were used to establish and compare some parameters of the molecular karyotype of nine stocks classified into *Trypanosoma cruzi* I and *T. cruzi* II groups. The isolates showed a variable number of chromosomal bands (17–22) comprised between 0.4 and 3.3 Mbp. The total number of chromosomes and the genome size were estimated based on the fluorescence intensity of SYBR Green I-stained chromosomal bands. Differences in the length of the telomeric regions among the stocks and between chromosomes of the same stock were observed. No correlation was found between the length of the telomeric region and the group to which the isolate belongs. Hybridization of 54 genetic markers revealed extensive chromosome size polymorphism. Nevertheless, the most represented pattern was the hybridization of the probes in larger chromosomes in stocks of *T. cruzi* II as compared to *T. cruzi* I. Eight putative syntenic groups, encompassing 29 non-redundant genetic markers and distributed in 11 CL Brener chromosomal bands were disclosed. The syntenic groups were conserved in all the stocks. The relative abundance of repetitive DNA sequences was determined. C6, B11/L1Tc and E12 elements presented maximum 1.7-fold variation in copy number, whereas 195-bp satellite DNA (120,000 copies in Y strain) was four- to nine-fold more abundant in *T. cruzi* II stocks. The novel aspects of *T. cruzi* karyotype here presented contribute to the comprehension of the genome organization of this parasite and will assist the assignment of scaffold to the CL Brener chromosomal bands.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Molecular karyotype; Chromosome markers; Gene synteny; Telomeric region; Repetitive DNA

1. Introduction

The protozoan *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease of major medical significance in Latin America. This disease

has a broad spectrum of clinical presentations, which vary in different geographical regions, possibly reflecting both parasite and host genetic factors. The genetic diversity of *T. cruzi* stocks has been widely documented based on DNA markers of nuclear and mitochondrial genomes. It has been proposed that *T. cruzi* genotypes are distributed into two major groups [1,2], which were named as *T. cruzi* I and *T. cruzi* II [3]. *T. cruzi* I group is relatively homogeneous, whereas *T. cruzi* II was further divided into five sub-groups (IIa–IIe) [4]. Epidemiological studies suggest that *T. cruzi* I strains circulate in the sylvatic cycle of the parasite transmission, whereas *T. cruzi* II strains are related to the domestic cycle and predominate where Chagas disease is more severe [5].

The nuclear DNA content of *T. cruzi*, estimated by different techniques, varies extensively between strains and

Abbreviations: DHFR-TS, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase; EF-1 α , a subunit of the elongation factor I; ESTs, expressed sequence tags; HT, hexose transporter; ME, mini-exon; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; PPD, pyruvate phosphate dikinase; RNA hel, RNA helicase of the DEAD-box family; RNA pol II, RNA polymerase II; rRNA, ribosomal RNA; SLA, spliced-leader associated RNA; TEUF and TENF, ESTs from a non-normalized (TEUF) and normalized (TENF) cDNA library of CL Brener epimastigotes; TR, trypanothione reductase; TS, *trans*-sialidase; α -T, α -tubulin

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3810x217; fax: +55 11 3815 5579.

E-mail address: zingales@iq.usp.br (B. Zingales).

clones of the same strain [6]. In several protozoa, including *T. cruzi*, the chromatin is poorly condensed during mitosis, and the identification of chromosomes can only be achieved by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (reviewed in [7]). Karyotype genetic analyses suggest that *T. cruzi* is diploid and that the genome is distributed in homologous pairs of chromosomes, which in general differ in size. Hybridization of chromosomal bands with specific DNA probes revealed extensive karyotype diversity among the stocks. However, a certain correlation was found between the hybridization patterns and strain division into the two major lineages (reviewed in [7]). More recently, data from chromosome size polymorphism studies have been used to obtain evolutionary information on *T. cruzi* groups [8,9].

Clone CL Brener (*T. cruzi* sub-group IIe) was chosen as the reference organism for the genome project [10]. Analyses of multilocus markers, ribosomal RNA genes, nuclear and mitochondrial gene genealogies and genetic variability in intergenic regions of coding genes indicate that CL Brener is a hybrid organism, derived from genetic exchanges between strains of *T. cruzi* II sub-groups and *T. cruzi* I [11–13]. CL Brener diploid genome, estimated as 87 Mbp, is distributed in approximately 20 chromosomal bands, sized from 0.45 to 3.5 Mbp [14]. These bands comprise 64–80 chromosomes [7,14]. So far, almost 300 genetic markers have been assigned to the CL Brener chromosomal bands ([15] and cited references). The definition of the physical map of the chromosomes and the genetic linkage groups can be used as an initial effort to validate the scaffolding process and assign scaffolds to chromosomal bands (scaffolds are group of contigs known to be physically linked).

Although the sequencing of CL Brener genome is now nearing completion, it is clear that this information will not cover the high genetic diversity of the parasite. At present, sequencing of Esmeraldo strain genome, representative of *T. cruzi* sub-group IIb [4] and a non-hybrid genotype [13], is under way (N. El-Sayed, personal communication). This effort will assist the assembly of CL Brener sequence information. Aiming at the characterization of allele variation in *T. cruzi*, the comparative analysis between the karyotype of CL Brener and other isolates is of relevance. These data will also provide a better understanding of the organization and plasticity of *T. cruzi* genome.

In a previous report, we have mapped 23 coding sequences on the chromosomes of nine *T. cruzi* stocks [9]. Phenetic analyses of karyotype data based on the absolute chromosomal size difference index indicated that chromosomes are valuable characters for identification of evolutionary groups, in particular, *T. cruzi* hybrid organisms [9]. In the present study, we have characterized and compared more extensively the molecular karyotype of these stocks, defined the number and size of chromosomes and estimated the genome size. We have also localized additional 48 genetic markers of RNA and protein coding genes on the chromosomes, defined putative syntenic groups, analyzed the size of telomeric regions

and characterized the chromosomal distribution and relative abundance of repetitive DNA sequences.

2. Materials and methods

2.1. Stocks

Nine stocks were considered in this study. Three stocks were classified into *T. cruzi* I group: Silvio X10 cl1, Dm28c and YuYu; and six into *T. cruzi* II group: CL Brener (sub-group IIe), Esmeraldo cl3 (sub-group IIb), Y (sub-group IIb), NRcl3, SO3 cl5 and Sc43 cl1 (sub-group IId) [3,4]. CL Brener and stocks of sub-group IId are considered hybrid genotypes [11–13]. All the stocks except Y and YuYu are cloned populations. The characteristics of these strains, procedures for parasite cultivation and sample preparation for PFGE have been described elsewhere [9].

2.2. Molecular karyotyping, probes and hybridization

Chromosome-sized DNA molecules of *T. cruzi* isolates were separated by PFGE in a Gene Navigator apparatus (Pharmacia) for 132 h under conditions previously described [14]. To obtain a better resolution of large chromosomes (2.3–3.5 Mbp), the gel was run for 150 h. To obtain a fine resolution of chromosomes between 1.6 and 0.9 Mbp, the gel was run for 87 h, with homogeneous pulses (N/S; E/W) of 350 s at 84 V constant voltage. The chromosome sizes were estimated from a calibration curve using molecular size standards represented by chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen) and *Hansenula wingei* (Invitrogen). The gel was stained with ethidium bromide and DNA was transferred to Zeta-Probe membranes (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Fifty-four genetic markers were mapped on chromosomal bands: 28 expressed sequence tags (ESTs) obtained from a normalized and a non-normalized cDNA library of CL Brener epimastigotes (named as TENF and TEUF, respectively) and 26 *T. cruzi* cloned sequences characterized in different laboratories. The designation of the markers, their accession numbers and relevant information are indicated in [Supplementary data](#). The DNA probes were obtained as previously described [9] and labeled with ($\alpha^{32}\text{P}$) d-ATP using the random primer extension labeling system (BRL). The blots were hybridized under conditions previously described [9] and washed to final stringency of $1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ at 60°C . The chromosomes were also hybridized with the oligonucleotide (5'-CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC-3') corresponding to the trypanosomatid telomeric region [16]. This probe was phosphorylated with ($\gamma^{32}\text{P}$) r-ATP and hybridized at 58°C . The membranes were exposed to X-ray films with intensifying screens at -80°C . Alternatively, the radioactive images were collected in phosphor screens and scanned with the Storm system (Molecular Dynamics). Prior to further probing, the blots were stripped by washing at $0.1 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{ SDS}$ at 90°C for 60 min.

Membranes were exposed to phosphor screens to verify the efficiency of the process.

2.3. Estimation of the length of telomeric regions

Epimastigote DNA was obtained by standard procedures. Genomic DNA (500 ng) was digested with *Sau3AI*, *MspI*, *HaeIII* and *AluI* for approximately 12 h, run on 1% agarose gels and transferred to nylon Hybond N membranes. The blot was hybridized with the telomere oligonucleotide under conditions described above. Chromosomal DNA was isolated from chromosomal bands as previously described [17], digested with the four restriction enzymes and hybridized with the telomeric probe as above.

2.4. Densitometric analysis of chromosomal bands and genome size estimation

Chromosomal DNA of *T. cruzi* stocks and *S. cerevisiae* (diploid strain) (Invitrogen) was separated by PFGE and stained with SYBR Green I (Molecular Probes) (1–10,000 dilution in 0.5× TBE, pH 8.0) for 1 h at RT. The gel was digitalized in the Storm system (Molecular Dynamics) and the densitometric analysis of the fluorescence intensity was obtained with the applicative ImageQuant (Molecular Dynamics). For the data analysis, we have elaborated a mathematical model that takes into consideration that the ratio between the fluorescence value of a chromosomal band (F) and its molecular size (M) is a constant ($F/M = k$). The lowest F/M ratio was attributed to the band containing one chromosome and the relative abundance of chromosomes in the other bands was estimated. The genome size (Mbp) of the stocks was calculated by the cumulative addition of the number of chromosomes comprised in each band multiplied by its corresponding molecular size.

2.5. Determination of the relative abundance of repetitive DNA sequences

The repetitive sequences analyzed in this study were: six ESTs and sequences encoding GP85 and GP82 glycoproteins; *trans*-sialidase (TS); C6 and B12 repetitive elements; B11/L1 *T. cruzi* retrotransposon and 195-bp satellite DNA (accession numbers in [Supplementary data](#)). The relative abundance of the repetitive sequences was determined according to a protocol previously reported [18]. Briefly, different amounts of genomic DNA were applied to Zeta-Probe membranes (Bio-Rad) using a slot-blot apparatus (Bio-Rad). DNA was denatured and fixed on the membrane. Samples were hybridized with random primed ^{32}P -labeled repetitive DNA probes and one probe corresponding to the gene encoding the α subunit of the elongation factor 1 (EF-1 α) (L76077) at 60 °C for 14 h. The membranes were washed at 60 °C, 30 min each, in 3× SSC/0.1% SDS and 1× SSC/0.1% SDS. The radioactive images were collected in phosphor screens exposed for different times and scanned with the

Storm system (Molecular Dynamics). The relative copy number was calculated by densitometric analysis of the radioactive signals using the ImageQuant program (Molecular Dynamics). For each strain and each probe, linear regression curves were determined for DNA amounts blotted on the membrane and hybridization signals. A unitary value was attributed to the lowest hybridization signal for a given amount of DNA for each strain and each probe. The relative copy number of the repetitive DNA sequence was estimated taking into consideration the genome size of the stock determined in this study ([Table 1](#)). The data were normalized using as a control the hybridization with the EF-1 α probe [18].

3. Results and discussion

3.1. Molecular karyotype and number of chromosomal bands

The chromosomal bands of nine *T. cruzi* stocks were separated by PFGE and stained with ethidium bromide ([Fig. 1A](#)). Different electrophoretic conditions were used to obtain a better resolution of larger chromosomes (2.3–3.5 Mbp) and of bands ranging between 1.6 Mbp and 0.9 Mbp (data not shown). The size and number of the chromosomal bands varied considerably among parasite strains: 19–22 chromosomal bands were observed in *T. cruzi* II stocks and 17–18 bands in *T. cruzi* I stocks. *T. cruzi* II stocks showed bands of larger molecular size (up to 3.3 Mbp) as compared to *T. cruzi* I (up to 2.7 Mbp) ([Fig. 1A–C](#)). The intensity of the ethidium bromide fluorescence was not evenly distributed along all bands suggesting that two or more chromosomes can co-migrate in the same band ([Fig. 1A](#)). To confirm the integrity and identity of chromosomes, the blot was hybridized with a probe representing the consensus telomeric sequence of trypanosomatids ([Fig. 1B](#)). There was a good correlation between the hybridization profiles with the telomeric probe and the ethidium bromide fluorescence patterns. After scanning of the autoradiogram, the size of the chromosomal bands of each stock was determined. The schematic representation of the chromosomal bands of nine stocks is shown in [Fig. 1C](#). [Table 1](#) summarizes the data of four stocks, representative of *T. cruzi* major groups and sub-groups: Silvio X10 cl1 (*T. cruzi* I), CL Brener (IIe), Esmeraldo cl3 (IIa) and SO3cl5 (IIId). Stocks of sub-group IIId have been considered hybrid genotypes by different criteria [1,9,12,13,17]. In a previous report, chromosomal bands of CL Brener were numbered in roman numerals (I–XX) [14]. Although the number of bands determined by us in this strain coincide with that reported by these authors, slight variation in the molecular sizes of several bands was verified. For differentiation, we numbered the bands of all the isolates in Arabic numerals, starting from the smallest band in each stock. The karyotype of the isolates proved to be stable during continuous sub-culturing for a six-year period.

Table 1
Number and size of chromosomal bands and number of chromosomes per band

CL Brener			Esmeraldo cl3			SO3 cl5			Silvio X10 cl1		
A ^a	B ^b	C ^c	A	B	C	A	B	C	A	B	C
20	3.26	2	19	3.26	2	22	3.26	3	17	2.70	1
19	2.87	3	18	2.50	2	21	2.74	3	16	2.32	2
18	2.60	1	17	2.32	2	20	2.38	2	15	2.00	2
17	2.44	2	16	2.07	1	19	2.18	1	14	1.70	2
16	2.21	2	15	1.95	2	18	2.02	3	13	1.42	3
15	1.64	2	14	1.55	4	17	1.72	3	12	1.29	3
14	1.50	3	13	1.44	6	16	1.62	3	11	1.17	3
13	1.41	2	12	1.34	7	15	1.54	5	10	1.06	4
12	1.30	2	11	1.23	2	14	1.43	4	9	0.99	1
11	1.22	2	10	1.18	2	13	1.33	3	8	0.91	3
10	1.18	1	9	1.09	5	12	1.18	6	7	0.82	3
9	1.13	7	8	0.96	3	11	1.09	2	6	0.75	3
8	1.04	6	7	0.87	3	10	1.00	4	5	0.72	3
7	0.97	4	6	0.84	3	9	0.99	5	4	0.67	2
6	0.89	2	5	0.79	2	8	0.91	3	3	0.62	7
5	0.76	2	4	0.72	9	7	0.87	1	2	0.57	2
4	0.69	3	3	0.59	8	6	0.79	5	1	0.51	1
3	0.64	2	2	0.55	1	5	0.75	3			
2	0.59	1	1	0.53	1	4	0.66	7			
1	0.50	1				3	0.60	1			
						2	0.55	3			
						1	0.46	3			
N ^d		52			65			72			44
S ^e		69.6			78.5			94.7			46.8

^a A: chromosomal bands were numbered in Arabic numerals.

^b B: size of the chromosomal band in Mbp.

^c C: number of chromosomes per band determined by fluorescence after SYBR Green staining.

^d N: number of total chromosomes.

^e S: genome size (Mbp).

Fig. 1. Molecular karyotype of *T. cruzi* stocks. Chromosomal DNA was separated by PFGE and stained with ethidium bromide (A); after transfer to Zeta-Probe membranes, the blot was hybridized with ³²P-labeled oligonucleotide corresponding to the trypanosomatid telomeric sequence (B); schematic representation of the chromosomal bands of the stocks. Molecular size markers (in Mbp) on the left.

3.2. Length of the telomeric region

To compare the length of the telomeric region in *T. cruzi* stocks, we followed the protocol previously published [19]. Genomic DNA was digested with four-base cutting enzymes, based on the assumption that telomere repeats lack recognition sites for most restriction enzymes. After transfer to nylon membranes, the blot was hybridized with the telomeric probe. As shown in Fig. 2A, the hybridization pattern indicated differences in the length of the telomeric regions among the strains. This could be due to variation in the number of hexameric repeats at the chromosomal ends or the presence of strain-specific telomere-adjacent sequences without the restriction sites for the endonucleases used in this study (cf. [19]). In Fig. 2A, it is observed that the Y strain has the smallest telomeric region (0.5–1.5 kb), which may explain the weak hybridization of the telomeric probe with the chromosomal bands of this strain as compared to other strains (Fig. 1B). It has been proposed that the size of the telomeric region could be correlated with the separation of *T. cruzi* into two groups. *T. cruzi* I would have long telomeres and *T. cruzi* II, short telomeres [19]. CL Brener (long telomeres) would be an exception in *T. cruzi* II group [19]. The data here presented indicate that this correlation does not stand.

In CL Brener, the telomeric probe hybridized to fragments ranging in size from 1.2 to >10 kb (Fig. 2A). To verify the variation of the size and/or organization of the telomeric region in CL Brener chromosomes, chromosomal bands 11–13 were isolated from the gel, and independently digested with four restriction enzymes. After DNA transfer, the blot was hybridized with the telomeric probe. DNA fragments from 1.5 to >5 kb were observed in the DNA puri-

fied from each band (Fig. 2B), which may correspond to the telomeric regions of the chromosomes that co-migrate in the band.

3.3. Number of chromosomes and genome size

To define the number of chromosomes per band and the genome size of *T. cruzi* stocks, chromosomal bands were separated by PFGE and stained with SYBR Green I. This dye has been used for quantification of DNA double-strand breaks in PFGE separated samples [20]. The fluorescence intensity of the chromosomal bands was determined by the applicative ImageQuant (Molecular Dynamics). For the analysis of the data, we have elaborated a mathematical model that takes into consideration that *T. cruzi* is diploid and the ratio between the fluorescence value of a chromosomal band (F) and its molecular size (M) is a constant ($F/M = k$). According to this model, if all the bands have the same number of chromosomes, all the ratios F/M should have the same value. This model was validated with the chromosomal bands of *S. cerevisiae*, which contain two chromosomes per band (data not shown). For *T. cruzi* strains, we obtained graphics M versus F . No saturation of the fluorescence signal was observed for any of the bands. On the other hand, we observed that there was not a linear correlation for all the experimental points (data not shown), most probably because more than one chromosome co-migrated in the same band. The lowest F/M ratio was attributed to the band containing one chromosome and the relative abundance of the chromosomes in the other bands was estimated. The number of chromosomes comprised in each band presented in Table 1 took into consideration the values estimated from the SYBR Green experiments and the hybridization patterns of the individual probes and the syntenic groups (see below). Accordingly, we estimated 52, 65, 72 and 44 chromosomes, respectively, for CL Brener, Esmeraldo cl3, SO3 cl5 and Silvio X10 cl1. Nevertheless, due to the presence of compression zones in the gel of pulsed-field electrophoresis it is possible that the number of chromosomes has been under-estimated.

The genome size of each stock was calculated by the cumulative sum of the number of chromosomes comprised in each band multiplied by the molecular size of the individual band. A genome size of approximately 70 Mbp was estimated for CL Brener. Values of 47 Mbp and 78 Mbp were obtained, respectively, for Silvio X10 cl1 and Esmeraldo cl3. The largest genome of 94.7 Mbp was observed for the hybrid stock SO3 cl5. In a previous work, the number of chromosomes of CL Brener has been estimated to be 64 and the genome size, 87 Mbp [14]. This calculation was based on the hybridization intensity of the telomeric probe, on the assumption that the telomeric region had the same size in the distinct chromosomes. Our data showing that the length of the telomeric region varies between different chromosomes of CL Brener hinders the use of this approach for estimation of the total number of chromosomes, and, consequently, the genome size.

Fig. 2. Length of the telomeric region. Genomic DNA of *T. cruzi* stocks (A) and DNA isolated from CL Brener chromosomal bands 11–13 (B) were digested with four-base cutting enzymes, transferred to nylon membranes and hybridized with 32 P-labeled telomeric probe. Molecular size markers (in kb) on the left.

These data suggest that the genome size of *T. cruzi* I strains is smaller than that of *T. cruzi* II, in agreement with previous conclusions [9]. The increase in the number and size of chromosomes in *T. cruzi* II strains may reflect a speciation event and supports the distant relationship between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups [8,9,21]. The largest genome of the hybrid stocks of sub-group IId could be resultant from hybridization and recombination processes between distinct genotypes [1,9,13,17]. In fact, aneuploidy in these strains has been verified [9]. The increase of the genome size of *T. cruzi* II and hybrid genotypes could reflect an adaptive characteristic related to the epidemiological attributes of these strains, which predominate in areas where Chagas disease is more severe [5].

3.4. Mapping of genetic markers on *T. cruzi* chromosomal bands

To investigate the degree of conservation of the genome of the isolates, we compared the distribution of 54 genetic markers on the chromosomal bands. These markers comprised 28 ESTs derived from cDNA libraries of CL Brener epimastigotes and 26 cloned sequences of different *T. cruzi* strains, coding for proteins, RNA or non-transcribed sequences. The hybridization patterns were divided into two classes: (i) markers ($n=41$) hybridizing with one to four bands and (ii) markers ($n=13$) hybridizing with five or more bands. The size of the chromosomal bands where markers of the first class hybridized is indicated in [Supplementary data](#) in descending numerical order taking as reference CL Brener. We observed that only three probes of the 54 markers (5.5%) hybridized with chromosomal bands of very similar molecular size in all the stocks. The most frequent pattern (18 probes of 54; 33%) was the hybridization to larger chromosomes in *T. cruzi* II strains when compared to *T. cruzi* I. Thirty-eight probes hybridized with two chromosomal bands in several stocks, which can represent different-sized homologous chromosomes [8,9].

The karyotypes of hybrid stocks of sub-group IId (NR cl3, SO3 cl5 and SC43 cl1) were very similar. These patterns differed from that determined for CL Brener (sub-group IIe), which is also a hybrid organism [11–13]. This observation further supports a different origin for the two groups of hybrid strains [9]. The schematic representation of the karyotypes of four stocks regarding the distribution of the genetic markers is shown in [Fig. 3](#).

A recent report has assigned 210 genetic markers to the chromosomal bands of CL Brener [15]. We observed a coincidence between 13 ESTs and 3 cloned genes analyzed in that study and in ours. Thirteen of these markers were assigned to the same chromosomal bands of CL Brener by the two laboratories. Three markers were assigned to different-sized bands (TEUF 0022, TEUF 0037 and TEUF 0110).

Six ESTs (listed in [Supplementary data](#)) hybridized with several bands (data not shown), suggesting they correspond to repetitive sequences. This was also observed for sequences

coding for GP85, GP82 and *trans*-sialidase. This result was expected, since these genes belong to multigene families (references in [15]).

3.5. Identification of syntenic groups conserved between the stocks

In a previous study, we mapped 23 coding sequences on the chromosomes of the same stocks here analyzed [9]. The hybridization pattern of six genetic markers suggested they were syntenic (unpublished observation). Therefore, these markers were included among the probes here mapped. We observed that several markers generated identical hybridization patterns to the chromosomal bands of the same isolate and of the other isolates, strongly suggesting they are syntenic. In fact, the identification of a syntenic group based on the analysis of a single strain may lead to confound one chromosome with a chromosomal band. The analysis of the autoradiograms of these probes allowed the definition of eight putative syntenic groups, which comprise 29 non-redundant genetic markers. Here, the term “synteny” refers to gene *loci* localized on the same chromosome regardless of whether or not they are genetically linked by classical linkage analysis [22]. The sequences included in each syntenic group are shown in [Fig. 4A](#), where the CL Brener chromosomal bands where each group is localized are also indicated. The molecular sizes of the chromosomal bands of the other isolates can be found in [Supplementary data](#). The hybridization patterns of four syntenic groups are shown in [Fig. 4B–E](#), and the syntenic markers are underlined in the schematic representation of the karyotype of four stocks in [Fig. 3](#). The syntenic group 1, defining chromosomal band 20 of CL Brener, is found on high molecular size chromosomes of the other strains ([Fig. 4B](#)). Genes encoding one hexose transporter, DNA J and trypanothione reductase belong to this group, as well as five ESTs ([Fig. 4A](#)). The best hit obtained by BLASTN and/or BLASTX programs ($E \leq 10^{-5}$) indicated that TEUF 0181 presents similarity with an hexose transporter and that TEUF 0001 and TEUF 0113 have similarity with Histone H2b. The internal consistency of the data indicates that the conclusions are reliable. It has been suggested that the hexose transporter and DNA J coding genes belong to the same transcription unit in trypanosomatids and that their products may be functionally related [23]. The confirmation of the putative syntenic groups will be obtained after extensive sequencing of genomic clones and inspection of contigs. This analysis will also indicate whether the genes belonging to the same group are positioned in the same order and orientation.

Taken together, these data indicate that despite the karyotype polymorphism, the syntenic groups are conserved in the nine stocks. This suggests that the conservation of chromosome content is an important trait of the *T. cruzi* genome, which in turn could be explained by a low level of recombination between heterologous chromosomes and/or by specific constraints on the chromosomal genetic content. Conservation of linkage groups has been reported in New

Fig. 3. Schematic representation of the karyotypes of four stocks regarding the distribution of 41 genetic markers in the chromosomal bands. Underlined markers correspond to the syntenic groups identified in Fig. 4A. On the left of each panel, the chromosomal bands were stained with ethidium bromide after PFGE.

Fig. 4. Identification of syntenic groups. Panel A: The genetic markers comprised in each syntenic group and the number of the CL Brener chromosomal band where each group maps. Panels B–E: Chromosomal DNA of *T. cruzi* stocks was separated by PFGE, transferred to Zeta-Probe membranes and hybridized with 32 P-labeled probes specified below each blot. Samples: (1) CL Brener; (2) Esmeraldo; (3) Y; (4) NR cl3; (5) SO3 cl5; (6) SC43 cl1; (7) Dm 28c; (8) Silvio X10; (9) YuYu.

World and Old World *Leishmania* species [24,25], as well as in *Plasmodium* species of rodent, simian and human malaras [26,27]. Using sequence information from some homologous chromosomal segments, it has been verified that despite high level of divergence at sequence level, *T. brucei*, *T. cruzi* and *L. major* exhibit a strong conservation of gene order [28].

It has been speculated that conservation of linkage groups in trypanosomatid species may be related to the polycistronic transcription process observed in these organisms. The maintenance of the co-direction of replication and transcription seems to be an important trait and this would lead to selection against most genome rearrangements.

3.6. Chromosomal distribution and genome abundance of repetitive DNA elements

Chromosome size variability among *T. cruzi* isolates has been attributed mainly to: (i) expansion/contraction of telomeric repeats, which are responsible for small size-variations (up to 35 kb); and (ii) amplifications/deletions

among tandemly repeated sequences, which cause larger size-differences (up to 400 kb) (reviewed in [29]). Approximately 30% of *T. cruzi* genome is represented by repetitive DNA sequences.

The presence of repetitive DNA sequences renders whole genomic sequence assembly a difficult task. Therefore, we decided to map four well-characterized repetitive DNA elements on the chromosomal bands and determine their relative abundance in the stocks. The elements here analyzed were: C6 sequence (1433 bp; 1000 copies in the G strain [30]); retrotransposon B11/L1Tc (5 kb; 2500 copies in the Tulahuen 2 strain [31]); E12 sequence (1123 bp; 5600 copies in the Maracay strain [32]); and the 195-bp satellite DNA (120,000 copies in the Y strain; [33,34]). As expected, these sequences hybridized with many chromosomal bands in all the stocks (Fig. 5A). However, the hybridization profiles were characteristic for each probe. Whereas B11/L1Tc retrotransposon and E12 element hybridized to all chromosomal bands, C6 element was more represented in high molecular size bands. Further, the 195-bp satellite was more abundant in *T. cruzi* II strains as compared with *T. cruzi* I.

Fig. 5. Distribution and relative abundance of repetitive DNA sequences in *T. cruzi* stocks. Chromosomal DNA was separated by PFGE, transferred to Zeta-Probe membranes and hybridized with ^{32}P -labeled probes specified above each blot (A and C, left panel); serial dilutions of DNA amounts indicated in the right panel in C (in nanograms) were dotted on Zeta-Probe membranes and hybridized with DNA probes (B); the relative abundance of each repetitive sequence was calculated based on the hybridization area obtained by the slot-blotting (D). Samples: (1) CL Brener; (2) Esmeraldo; (3) Y; (4) NR cl3; (5) SO3 cl5; (6) SC43 cl1; (7) Dm 28c; (8) Silvio X10; (9) YuYu.

To determine the relative abundance of the repetitive elements in the stocks, different amounts of genomic DNA (indicated in Fig. 5C) were applied onto Zeta-Probe membranes and hybridized with ^{32}P -labeled probes (Fig. 5B). Seven strains were analyzed because of space limitations of the slot-blot apparatus. For normalization of the data, the slot-blot was hybridized with the EF-1 α probe (accession number L76077) corresponding to a gene with a low copy number [35] (Fig. 5C). The hybridization signal intensity was quantified by using a phosphor image system and the relative abundance of each repetitive sequence was estimated as described in Section 2. For each probe, a unitary value was given to the strain that presented the lowest hybridization signal. The data shown in Fig. 5D indicated at most 1.7-fold variation between the strains in the relative abundance of C6; E12 and B11/L1Tc repetitive sequences. On the other hand, the 195-bp satellite DNA was four to nine times more abundant in *T. cruzi* II

strains as compared to *T. cruzi* I. The satellite DNA in CL Brener was approximately seven times more abundant than in Silvio X10 cl1 (Fig. 5D), in agreement with our previous determination [18].

Next we examined the distribution of the 195-bp satellite DNA in the chromosomal bands of the strains. For this purpose, chromosome blots were hybridized with the satellite probe and the radioactive image was scanned. For each strain, a unitary value was attributed to the band showing the lowest hybridization signal (Fig. 6). We observed that satellite DNA has a heterogeneous distribution in the chromosomes of the same strain and between the strains. For example, this sequence was more abundant in bands 8–20 of CL Brener (exception band 11) and was present in very low amount, or even absent, in small chromosomes (Fig. 6). It has been proposed that satellite DNA may have a structural role in *T. cruzi* chromosomes [18]. If this hypothesis

195-bp Satellite DNA

Fig. 6. Distribution of the 195-bp satellite DNA in the chromosomal bands of *T. cruzi* stocks. Chromosomal DNA was separated by PFGE, transferred to Zeta-Probe membranes and hybridized with ^{32}P -labeled 195-bp satellite probe. The radioactive image was scanned. The number of the chromosomal band is indicated above the peaks (see Table 1). For each strain, a unitary value was attributed to the band showing the lowest hybridization signal. Below each peak, the relative abundance of satellite DNA was estimated.

is correct, our observation suggests that other satellite-like sequences may substitute the 195-bp satellite function in chromosomes where this sequence was not encountered. In fact, search in database revealed that a distinct 195-bp repeat (AC 104504) is found in chromosome 4 of CL Brener.

3.7. CL Brener karyotype and the genome project

We have provided additional genetic markers for 16 CL Brener chromosomal bands, identified eight putative syntenic groups encompassing 29 non-redundant genetic markers, distributed in 11 CL Brener chromosomal bands and determined the relative abundance and chromosome distribution of repetitive DNA elements. This information will be useful for the physical mapping of CL Brener chromosomes and will assist the assembly at scaffold level.

Evidence indicates that CL Brener is a hybrid genotype [11–13] and that a “mosaic” of genes of different origins might exist in some regions of the genome [9]. In fact, homologous genetic markers derived from *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains have been mapped on different chromosomal bands of CL Brener [13,36]. It is expected that the data here presented concerning the molecular karyotype of isolates representative of *T. cruzi* major lineages will be of aid for the completion of CL Brener sequence effort and characterization of allele variation in *T. cruzi*.

It is clear that the sequencing of CL Brener will not cover the high genetic diversity of *T. cruzi* isolates. The conservation of syntenic groups suggests that a project to sequence other *T. cruzi* genomes will require far less resources than the CL Brener genome project. It is anticipated that a comparative genome approach will provide new insights into the biology of the parasite. In addition, identification of homologous genes, which may have diverged substantially, might help the assignment of the genes responsible for the epidemiological differences between *T. cruzi* isolates.

Acknowledgements

We thank Dr. Wim Degraeve and Dr. Adeilton Brandão (FIOCRUZ), Dr. José Franco da Silveira, Dr. Patrício Porcile, Dr. Sérgio Schenkman and Dr. Marcelo Briones (EPM/UNIFESP) and Dr. David Campbell (UCLA) for the kind gift of many genetic markers used in this study. We are indebted to Dr. José Franco da Silveira for critical reading of the manuscript and insightful suggestions. We thank Marcelo Nunes Silva for technical assistance. This work was supported by grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). N.V. has received a fellowship from FAPESP. A.P. is a graduate fellow from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.molbiopara.2004.08.005](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.08.005).

References

- [1] 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.
- [2] Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 1995;36:47–115.
- [3] Anon. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:429–32.
- [4] Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;30:35–44.
- [5] Zingales B, Souto RP, Mangia RH, et al. American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon sequences. *Int J Parasitol* 1998;28:105–12.

- [6] Dvorak JA, Hall TE, Crane MSJ, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 1982;29:430–7.
- [7] Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996;12:108–14.
- [8] Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, et al. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology* 2002;124:277–86.
- [9] Pedrosa A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:79–90.
- [10] Zingales B, Pereira ES, Oliveira RP, et al. *Trypanosoma cruzi* Genome Project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 1997;68:159–73.
- [11] Brisse S, Barnabé C, Bañuls A-L, Sidibé I, Noël S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:253–63.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Cano MI, Gruber A, Vazquez M, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 1995;71:273–8.
- [15] Porcile PE, Santos MRM, Souza RT, et al. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene* 2003;308:53–65.
- [16] Van der Ploeg LHT, Liu AYC, Borst P. Structure of the growing telomeres of trypanosomes. *Cell* 1984;36:459–68.
- [17] Stolf BS, Souto RP, Pedrosa A, Zingales B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126:73–80.
- [18] Elias MCQB, Vargas N, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:1–9.
- [19] Freitas-Junior LHG, Porto RM, Pirrit LA, Schenkman S, Scherf A. Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2451–6.
- [20] Kiltie AE, Ryan AJ. SYBER Green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2945–6.
- [21] Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:219–32.
- [22] Renwick JH. The mapping of human chromosomes. *Annu Rev Genet* 1971;5:81–120.
- [23] Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillie A, et al. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 1998;94:249–64.
- [24] Wincker P, Ravel C, Blaineau C, et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1688–94.
- [25] Britto C, Ravel C, Bastien P, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 1998;222:107–17.
- [26] Janse CJ, Carlton JMR, Walliker D, Waters AP. Conserved location of genes on polymorphic chromosomes of four species of malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1994;68:258–96.
- [27] Carlton JM, Galinski MR, Barnwell JW, Dame JB. Karyotype and synteny among the chromosomes of all four species of human malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol* 1999;101:23–32.
- [28] Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, et al. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 2004;134:183–91.
- [29] Dujardin JC, Henriksson J, Victoir K, et al. Genomic rearrangements in Trypanosomatids: an alternative to the “one gene” evolutionary hypothesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:527–34.
- [30] Araya J, Cano MI, Gomes HBM, et al. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1997;115:563–70.
- [31] Martin F, Maranon C, Olivares M, Alonso C, Lopez MC. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes. *J Mol Biol* 1995;247:49–59.
- [32] Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:271–80.
- [33] Sloof P, Bos JL, Konings AFJ, et al. Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol* 1983;167:1–21.
- [34] Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3356–60.
- [35] Billaut-Mulot O, Fernandez-Gomez R, Loyens M, Ouassii A. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α : nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 1996;174:19–26.
- [36] Cribb P, Tapia E, Diosque P, Serra E. Spliced leader RNA gene promoter sequence heterogeneity in CL Brener *Trypanosoma cruzi* reference strain. *Infect Genet Evol* 2004;4:153–7.