

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

ESTUDOS MOLECULARES DA LOCALIZAÇÃO GÊNICA DA PROTEÍNA
P21 DE *Trypanosoma cruzi* EM DIFERENTES CEPAS

Cecílio Purcino da Silva Souza Neto

Uberlândia
Maio - 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

ESTUDOS MOLECULARES DA LOCALIZAÇÃO GÊNICA DA PROTEÍNA
P21 DE *Trypanosoma cruzi* EM DIFERENTES CEPAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-Graduação
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre.

Cecílio Purcino da Silva Souza Neto
Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Uberlândia
Maio - 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729e
2014 Souza Neto, Cecílio Purcino da Silva
Estudos moleculares da localização gênica da proteína P21 de
Trypanosoma cruzi em diferentes cepas / Cecílio Purcino da Silva Souza
Neto. - 2014.
69 f. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Trypanosoma cruzi - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972-. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Cecílio Purcino da Silva Souza Neto

“Estudos moleculares da localização gênica da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* em diferentes cepas”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de maio de 2014.

Profa. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza – UNIFESP

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

Dedicatória

Aos meus pais. Aos meus amigos e companheiros de pesquisa.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, por sempre acreditar em nosso potencial.

Agradeço a todos do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pela convivência, pelo aprendizado diário, pelas trocas de experiências, pela irreverência e alegria;

Agradeço aos meus pais, principalmente a minha mãe que sempre esteve ao meu lado, apoiando em tudo que foi preciso.

Agradeço ao Prof. Dr. José Franco da Silveira e seu grupo de pesquisa por me conceder a oportunidade de finalizar esse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -32P	fosfato alfa radioativo
°C	graus Celsius
AA	aminoácido
Ama	amastigotas
dATP	desoxiadenina-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-trifosfato
dGTP	desoguanosina-trifosfato
DMEM	do inglês "Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAse	desoxirribonuclease
dNTP	deoxinucleotídeotrifosfato
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
Epi	epimastigotas
Fw	do inglês "Foward"
G	grama
GP	glicoproteína
GPI	glicosilfosfatidilinositol
H	hora
HEPES	ácido n-(2-hidroxietilo)-piperazina-n'-2- etanesulfônico
Kb	quilobase (1×10^3 bases)
kDa	quiloDalton (1×10^3 da)
L	litro
LB	meio de cultura Luria Bertani
LIT	infusão de fígado com triptose (do inglês "Liver Infusion Triptose")
LMT	do inglês "Low Melting Temperature"
L/O	leste/oeste
M	molar
mA	MiliaAmper

Mb	megabase
Meta	tripomastigotas metacíclicos
Mg	miligrama
Min	minutos
mJ	MiliJoule
mL	Mililitro
mM	milimolar
Neo	neomicina
Ng	nanograma
Nm	nanômetro
N/S	norte/sul
Nt	nucleotídeo
μCi	microCurie (1 ci = $3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo)
μF	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
OD	densidade óptica
Pb	pares de bases
PBS	solução salina fosfatada
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFA	paraformaldeído
PFGE	eletroforese de campo pulsado
PM	padrão de massa molecular
Pmol	picomol
PSG	solução salina fosfatada contendo glicose
Rev	do inglês "Reverse"
RNA	ácido ribonucleico
S	segundo
SFB	soro fetal bovino
SSC	tampão contendo citrato e cloreto de sódio
TBE	tampão contendo Tris, Borato e EDTA

TcChr	cromossomo <i>in silico</i> de Trypanossoma cruzi
TCT	tripomastigota de cultura de tecido
TE	tampão contendo Tris e EDTA
TRICT	tetrametilrodamina-b-isotiocianato
TRIS	tris [hidroximetil] aminometano
U	unidade
V	volt
x g	vezes a aceleração da gravidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências do gene da proteína P21 com alta similaridade, encontradas no banco de dados TrityDB	30
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rotas de migração da doença de Chagas de regiões endêmicas na América Latina para regiões não endêmicas e estimativa do total de indivíduos infectados em países não endêmicos..... 13
- Figura 2.** Ciclo de vida de *T. cruzi* (modificado de CDC, Centro de Controle de Doenças e Prevenção, USA)..... 15
- Figura 3** - Amplificação da sequência gênica da P21 em isolados de *T. cruzi*..... 32
- Figura 4** - Alinhamento das variantes do gene da proteína P21 depositadas no banco de dados do clone CL Brener de *T. cruzi* pelo programa MegAlign (DNASTAR). 33
- Figura 5** - Alinhamento das sequências preditas de aminoácidos de todas as variantes da P21 consideradas com alta similaridade apresentadas na tabela 1 programa MegAlign (DNASTAR)..... 34
- Figura 6** - Localização da sequência gênica da proteína P21 nos cromossomos TcChr22-S e TcChr22-P 36
- Figura 7** - Perfil de restrição *in silico* dos cromossomos TcChr22–S *in silico* de *T. cruzi* utilizando diferentes enzimas de restrição (BamHI, PvuII e EcoRI) e Perfil de restrição em DNA genômico de isolados de *T. cruzi* (CL Brener, G, Y e 115) pelas enzimas *PvuII*, *EcoRI* e *BamHI* separado por eletroforese em gel de agarose e posteriormente feito hibridização com a sonda radioativa da P21. 39
- Figura 8** - Polimorfismo dos cariótipos de isolados das linhagens de *T. cruzi* 40
- Figura 9** - Mapeamento dos marcadores específicos do cromossomo *in silico* TcChr22 (Bpp-1 e CSL4) e Sonda P21 para análise de sintenia. 43
- Figura 10** - Identificação de possíveis cromossomos homólogos na cepa Y. Os

marcadores pertencem ao cromossomo TcCh22 *in silico* 46

Figura 11 - Identificação de possível polimorfismo no tamanho cromossômico na cepa G. 47

Figura 12 - Identificação de possíveis rearranjos cromossômicos na cepa 115. 48

Figura 13 - Alinhamento entre regiões genômicas homólogas de *T. cruzi in silico* montado cromossomos TcChr22 (S e P) e contigs TcMARK_CONTIG_732 (*T. cruzi marinkelli*) e ADWP02000472 (Sylvio X10/1) 49

Figura 14 - Possíveis mecanismos de recombinação gênica que poderiam dar origem a polimorfismo cromossômico em *T. cruzi* 54

RESUMO

A proteína P21 foi recentemente caracterizada, sendo secretada por todas as formas evolutivas do parasita e desempenha papel durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicas e amastigotas extracelulares. A P21 pode induzir a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. Além disso, a P21 tem a capacidade de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4. Estudos feitos com o genótipo e o fenótipo de *T. cruzi* mostraram que esta espécie é representada por uma população muito heterogênea. Essa diversidade está relacionada com sua suscetibilidade a drogas, virulência, antigenicidade e variações em seu cariótipo molecular. Em 2005 foi finalizado o sequenciamento do genoma do clone CL Brener. Suas sequências, em 2009, foram organizadas em 41 pares homólogos, com tamanho entre 78kb e 2.3 Mb, provisoriamente chamado de cromossomos ou TcChr. *T. cruzi*, em geral, possui um genoma plástico com o tamanho do seu cromossomo podendo variar entre as diferentes cepas do parasita, apresentando bandas cromossômicas de 450 kb a 3 Mb. Estudos sugerem a ocorrência de grandes rearranjos cromossômicos durante a evolução deste parasita. A hipótese para tais rearranjos é a ocorrência de várias regiões repetitivas no DNA desse parasita ou ainda a estrutura cromossômica final de seus cromossomos, como as regiões teloméricas ou subteloméricas. No presente estudo, vimos que nos isolados do grupo Tc VI, Tc II e Tc I (CL Brener e CL, Y e G) a sua sequência se mantém sintênica, mas com uma região de rearranjos, porém quando observado a sua localização no isolado do grupo Tc V (Cepa 115), vimos que o cromossomo22 não somente teve redução de tamanho como também o seu tamanho corrigido formando cromossomos iguais. O presente trabalho mostrou que mesmo ocorrendo reprodução clonal no *T. cruzi*, isso não impede que haja variações em seu genoma. Essas variações podem promover ganho ou perda de conteúdo genômico. Assim podemos concluir que: A proteína P21 é exclusiva de *T. cruzi*, e ela pode ser considerada espécie-específica, portanto, poderia ser utilizada como marcador molecular para o taxon *T. cruzi*. O ambiente genômico da P21 denota um ambiente muito heterogêneo, porém importante no percurso evolutivo do parasita, pois há a localização de genes de proteínas importantes para a vida do mesmo. O cromossomo em que a sequência da P21 está localizada sofre rearranjos cromossômicos de acordo com as cepas estudadas.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*; Proteína P21; Ambiente Genômico; Cromossomos.

ABSTRACT

P21 protein was recently characterized, being secreted by all developmental forms of the parasite and plays a role during the invasion of non-phagocytic cells by metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes. P21 can induce the polymerization of the actin cytoskeleton of the host cell. In addition, P21 has the ability to enhance the phagocytic capacity of macrophages by a mechanism dependent protein binding to the chemokine receptor CXCR4. Studies of genotype and phenotype of *T. cruzi* showed that this species is represented by a very heterogeneous population. This diversity is related to their drug susceptibility, virulence, antigenicity, and variations in their molecular karyotype. In 2005 was completed the sequencing of clone CL Brener genome. In 2009, the genome was organized in 41 homologous pairs, with size between 78kb and 2.3 Mb, provisionally called chromosomes or TcChr. *T. cruzi*, in general, has a plastic genome size. Its chromosome may vary among different strains of the parasite, with bands of

450 kb to 3 Mb. Studies suggested the occurrence of rearrangements during the development of this parasite. The possibility for such rearrangements is the occurrence of several repeated regions of DNA of this parasite or the final chromosomal structure of its chromosomes, such as telomeric or subtelomeric regions. In the present study, we found that isolates of group Tc VI, Tc II and Tc I (CL Brener, CL, Y and G) kept its sequence syntenic, but with a region of rearrangements, but when observed its isolated location in group TcV (strain 115), we verified that not only had chromosome 22 size reduction as well as its size corrected forming equal chromosomes. The present study showed that even clonal reproduction occurring in *T. cruzi*, it could not prevent variations in its genome. These variations may promote gain or loss of genomic content. Thus, we can conclude that: P21 protein is unique to *T. cruzi* and it can be considered species-specific, so it could be used as a molecular marker for *T. cruzi* taxon. Genomic environment of P21 denoted an important and heterogeneous environment. The chromosome where P21 is located undergoes rearrangements as observed to the studied strains.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; P21 Protein; Genomic Environment; Chromosomes.

1. Introdução

2. Parasita e Doença

Trypanosoma cruzi é um protozoário parasita intracelular, pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, que infecta tanto o homem quanto outros hospedeiros mamíferos. É o agente etiológico da doença de Chagas e atualmente é considerada um dos grandes problemas de saúde pública da América Latina (TODOROV et al., 2000). A doença de Chagas é uma doença endêmica no continente latino americano e afeta entre 18 a 20 milhões de pessoas. Atualmente, devido a migrações populacionais, a doença tem se espalhado para regiões não endêmicas, como Estados Unidos, Europa, Austrália, Canadá e Japão, tornando assim um grande problema de saúde mundial (Figura 1) (SCHOFIELD et al., 2006; COURA & VIÑAS, 2010; HOTEZ et al., 2013).

Esse protozoário parasita caracteriza-se morfologicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças estruturais, antigênicas, genômicas e fisiológicas (BRENER et al., 1973; DE SOUZA et al., 1984).

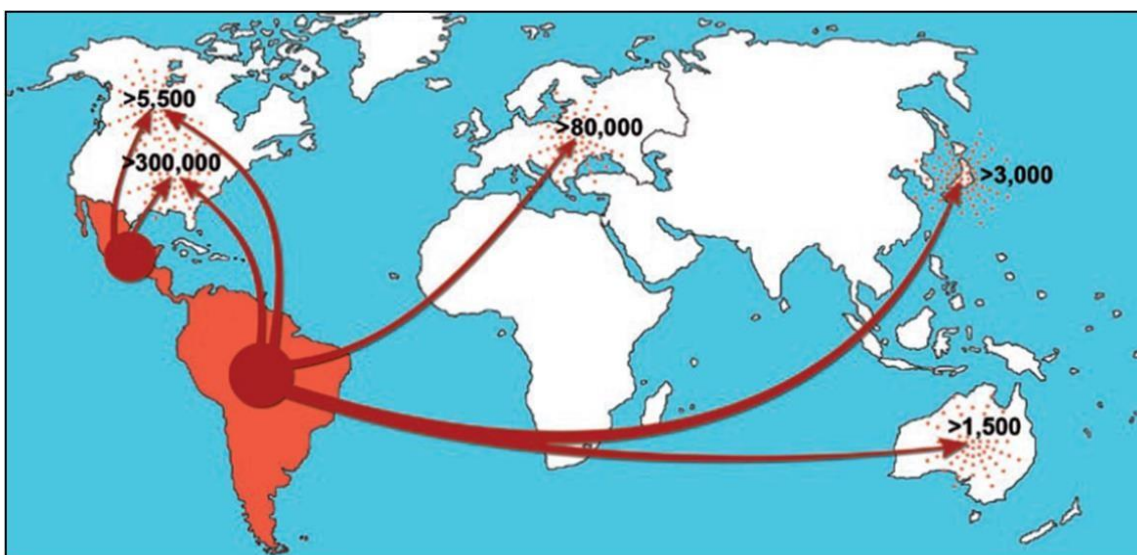


Figura 1. Rotas de migração da doença de Chagas de regiões endêmicas na América Latina para regiões não endêmicas e estimativa do total de indivíduos infectados em países não endêmicos. O número de indivíduos infectados com *T. cruzi* em cada região está indicado na figura (Coura & Viñas, 2010).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e uma fase extracelular no hospedeiro invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae (Figura 2). O ciclo inicia-se quando o inseto vetor, ao sugar o sangue dos mamíferos infectados com *T. cruzi*, ingere formas tripomastigotas sanguíneas que no estômago do vetor transforma-se em epimastigotas, e passam ao intestino delgado onde sofrem intensa multiplicação e posteriormente se diferenciam no reto em formas tripomastigotas metacíclicas, consideradas formas infectantes ao hospedeiro mamífero. Ao fazer o repasto sanguíneo em um novo animal, o triatomíneo elimina estas formas infectantes juntamente com suas fezes e urina. Assim, quando o hospedeiro mamífero coça o local da picada acaba ulcerando a pele e facilitando a penetração das formas infectantes do parasita. No sangue dos mamíferos, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem vários tipos celulares formando um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferenciam em amastigotas, que entram em processo de replicação e após romperem a membrana do vacúolo iniciam reprodução assexuada por divisão binária, e, depois de cerca de cinco dias, diferenciam-se em tripomastigotas que são liberadas no interstício após a lise da célula infectada. Uma vez livres no interstício essas formas tripomastigotas sanguíneas, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ainda ingeridos por outro triatomíneo durante seu repasto sanguíneo (DE SOUZA et al, 2000; MORTARA et al., 2008; RASSI et al., 2008; HERNANDEZ-OSORIO et al., 2010).

Um subciclo alternativo foi descrito envolvendo formas amastigotas no hospedeiro mamífero originárias da lise prematura das células infectadas, designadas amastigotas intracelulares (HUDSON et al., 1984; de CARVALHO et al., 1986; DE SOUZA, 1984) ou amastigotas extracelulares decorrentes da diferenciação extracelular de tripomastigotas, sendo estas formas capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas (PAN et al., 1978; LEY et al, 1988; MORTARA et al., 1991; ALVES& MORTARA., 2009). Essa capacidade das formas amastigotas de invadir células tem

sido compreendido como um modo alternativo de propagação do ciclo do parasita que auxilia na sobrevivência do mesmo no hospedeiro vertebrado (REGO et al., 1956; BURLEIGH & ANDREWS, 1995).

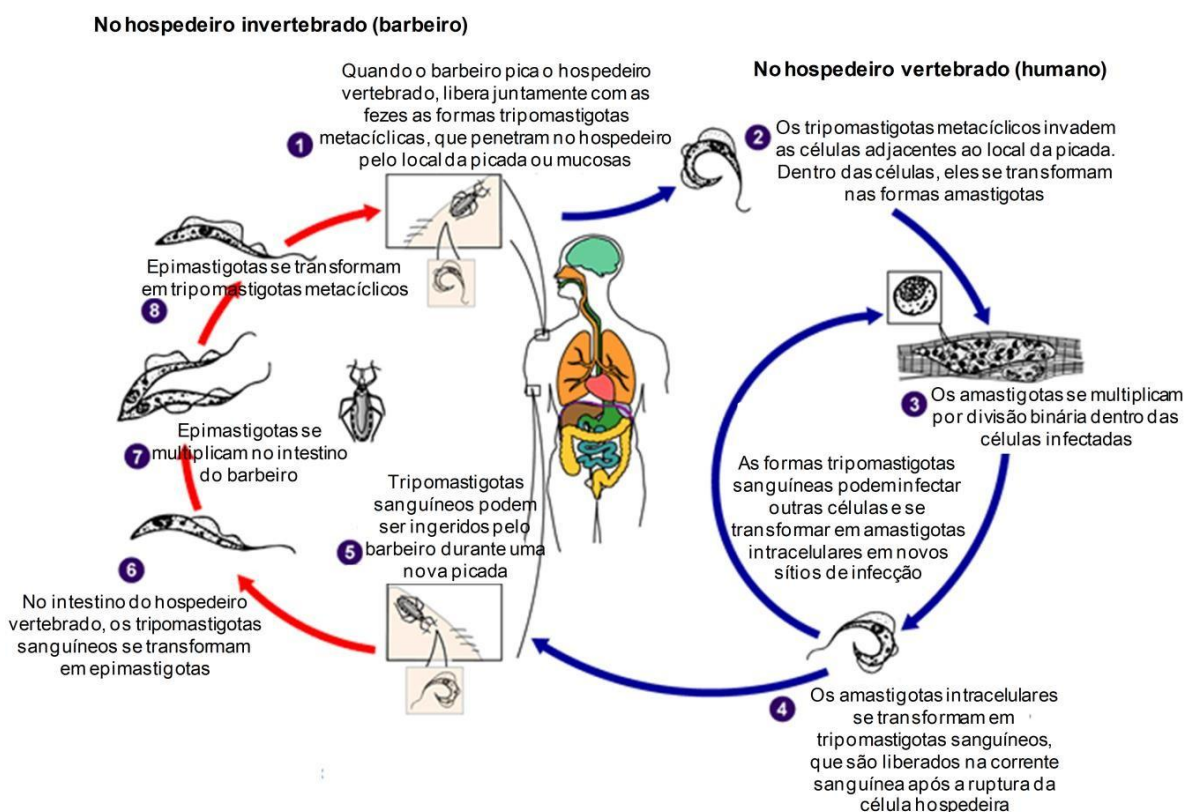


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (modificado de CDC, Centro de Controle de Doenças e Prevenção, USA).

Tradicionalmente, a transmissão da doença de Chagas se dá pelas fezes contaminadas do inseto vetor e eliminadas durante o repasto sanguíneo. Contudo, atualmente a transmissão oral por meio de alimentos contaminados tem sido a principal forma de infecção, especialmente no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991).

A manifestação da doença se dá em duas fases principais, a fase aguda e fase crônica. A fase aguda é caracterizada por altos índices de parasitemia (formas tripomastigotas) no sangue do hospedeiro enquanto que a crônica, pode se apresentar nas formas cardíaca, digestiva ou ainda indeterminada (MOTT et al., 2009). As sintomatologias mais importantes são as disfunções cardíacas, como inflamação crônica, hipertrofia e fibrose, provocando insuficiência e lesões cardíacas,

miocardiopatia, assim como disfunções gástricas como megacólon, megaesôfago, megaestômago, megaduodendo, megajejuno, dentre outras (MATSUDA et al., 2009). Atualmente não há nenhum tipo de vacina disponível e as drogas utilizadas no tratamento apresentam efeitos colaterais indesejáveis (SMULSKI et al., 2010).

2.1. Linhagens filogenéticas em *T. cruzi*

Há tempos que se discute a classificação dos isolados e cepas de *T. cruzi*. Esta discussão vem se prolongando devido à heterogeneidade biológica e genética encontrada entre as populações de cepas e isolados de parasitas.

Em 1970, o perfil de expressão de algumas isoenzimas do parasita foi empregado na classificação de isolados do *T. cruzi*. A partir desses estudos foram proposto três grupos filogenéticos, Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1980; MILES et al., 1977). Posteriormente a esse sistema, inúmeros estudos foram feitos para separar os grupos de *T. cruzi* como estudos taxonômicos baseados na técnica de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") do kDNA, técnicas de PCR para amplificação de gene que codifica rRNA 24Sα (gene que apresenta na extremidade 3' uma região divergente de aproximadamente 100pb, chamada D7), porém foi somente em 1990 que especialistas decidiram unificar as classificações existentes do *T. cruzi*. Foi proposto a divisão do taxón em duas linhagens denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). Essa nova divisão não incluiu os isolados de origem híbrida.

A outra proposta de reorganização dos grupos de *T. cruzi* aconteceu em no ano de 2000, baseando-se na tipagem dos isolados por RAPD e isoenzimas (BRISSE et al., 2000). Os grupos formados foram denominados de DTUs ("Discrete Typing Units"). Essa nova classificação gerou seis DTUs designadas como: I, IIa, IIb, IIc, IId e IId Os grupos híbridos que na prosposta anterior não tinha sido incluso, nessa nova prosposta se encaixariam no DTU IId e IId (Brisse et al., 2000).

A última proposta, utilizada nos tempos atuais, foi feita realizada em 2009 e decidiu classificar os isolados de *T. cruzi* em seis DTUs, nomeados Tc I, TcII, Tc III, Tc IV, Tc V e Tc VI (Zingales et al., 2009). Para essa classificação foram utilizados isolados representativos e bem conhecidos. No grupo Tc I foram incluídas as cepas G e Trycc:1161 e o clone Dm28c, no grupo Tc II forma incluídos a cepa Y e o clone

Esmeraldo cl3, no grupo Tc III está o clone SO3 cl5, no grupo Tc VI foi incluído o clone CL Brener, clone de referência do projeto genoma do *T. cruzi*.

2.2. Genoma de *T. cruzi*

Estudos feitos com o genótipo e o fenótipo de *T. cruzi* mostraram que esta espécie é representada por uma população muito heterogênea (MACEDO et al., 2004). Essa diversidade está relacionada com sua suscetibilidade a drogas, virulência, antigenicidade e variações em seu cariótipo molecular. Autores demonstraram que no seu núcleo a cromatina não se condensa em cromossomos mitóticos durante a divisão celular (SOLARI et al., 1980). Este fato se deve em parte a grande variação no centro de histonas H1 (HECKER & GANDER, 1985). Assim, o cariótipo de *T. cruzi* não pode ser analisado por técnicas de citogenética clássicas, sendo necessário utilizar outras técnicas como a eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE).

Em 2005 foi finalizado o sequenciamento do genoma do clone CL Brener (EL-SAYED et al., 2005). Suas sequências, em 2009, foram organizadas em 41 pares homólogos, com tamanho entre 78kb e 2.3 Mb, provisoriamente chamado de cromossomos ou TcChr. O clone CL Brener teve suas sequências gênicas organizadas em conjunto de sobreposição de segmentos de DNA, segmentos que juntos representam uma região consenso de DNA chamada de *contigs* e *scaffold* (WEATHERLY et. al, 2009). O seu sequenciamento mostrou que o mesmo possui 2 haplótipos denominados de haplótipo Esmeraldo (S) e não-Esmeraldo (P), sendo assim considerado híbrido. O tamanho dos cromossomos *in silico* podem estar possivelmente subestimado, por causa da grande variação alélica e do grande número de sequências repetitivas (BRISSE et al., 1998; MACHADO et al., 2001). Esse tamanho ainda pode ser diferente daqueles representados pelas análises feitas em eletroforese de campo pulsado (PFGE). Neste sentido, o clone CL Brener apresenta até 20 bandas cromossômicas com tamanho entre 3.27 e 0.51 Mb (CANO et al., 1995).

T. cruzi, em geral, possui um genoma plástico (GIBSON et al., 1986; WAGNER., 1990). O tamanho do seu cromossomo pode variar entre as diferentes cepas do parasita, apresentando bandas de 450 kb a 3 Mb (ARAYA et al., 1994). A variabilidade no tamanho do genoma de *T. cruzi* pode ter implicações diretas na

organização do seu genoma. Análise do cariótipo molecular em diferentes cepas e clones de *T. cruzi* mostra diferenças de até 50% no tamanho do cromossomo em organismos geneticamente equivalentes (HENRIKSSON et al., 1995). Este fato sugere a ocorrência de grandes rearranjos cromossômicos durante a evolução deste parasita. A hipótese para tais rearranjos é a ocorrência de várias regiões repetitivas no DNA desse parasita ou ainda a estrutura cromossômica final de seus cromossomos, como as regiões teloméricas ou subteloméricas. Essas regiões são consideradas como hotspots de eventos de recombinação gênica (LEPHART PR et. al, 2005;). *T. cruzi* sofre proliferação celular com raros eventos de recombinação genética (TIBAYRENC et al., 1990). Não obstante, é sabido que ocorrem fusão de genótipos parentais, perda de alelos, recombinação homóloga, e herança uniparentais do DNA do cinetoplasto. Estes resultados sugerem que quebras de DNA e rearranjos cromossômicos podem ocorrer durante a expansão proliferativa em *T. cruzi*, particularmente durante replicação de DNA e mitose (BINGLE et al., 2001).

O genoma de *T. cruzi* tem como principal característica a presença de sequências repetitivas e famílias multigênicas, que podem totalizar 50% de todo o seu genoma. As sequências repetitivas são representadas por micro- e minissatélites, retrotransposons e repetições teloméricas, enquanto as famílias multigênicas codificam principalmente proteínas de superfície (EL-SAYED et al., 2005a). Essas famílias são, por exemplo, superfamília das trans-sialidades, "mucin-associated surface protein" (MASP), mucinas, "retrotransposon hot spot protein" (RHS), "dispersed gene family protein 1" (DGF-1). A "surface protease GP63" quando comparadas entre outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* podem representar uma expansão gênica. Ela possui apenas 4 a 13 genes codificando em *T. brucei* e *L. major* em contrapartida no *T. cruzi* apresenta de mais de 420 genes, mostrando claramente a expansão gênica.(EL- SAYED et al., 2005a).

2.3. Invasão celular

A invasão celular por patógenos intracelulares representa um evento complexo, usualmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY et al., 1981). Neste contexto, a superfície celular desempenha o principal papel no estabelecimento de qualquer relação parasita-hospedeiro e a identificação das moléculas envolvidas neste processo torna-se um passo obrigatório para buscar novos recursos de tratamento para a doença provocada por esse parasita. A infectividade de tripomastigotas metacíclicos de diferentes isolados de *T. cruzi* tem sido associada com a expressão diferencial de proteínas de superfície (RAMIREZ et al., 1993; RUIZ et al. 1998). O parasita liga-se a receptores na superfície da célula hospedeira, é internalizado e logo escapa para o citosol onde ele se diferencia, replica, cresce e espalha a infecção para as células vizinhas através da matriz extracelular e para células distantes através da circulação (CHUENKOVA et al., 2008; PERRIN, 2008). Vários estudos têm demonstrado que *T. cruzi* desenvolveu, ao longo da sua co-evolução com os mamíferos, diversos mecanismos capazes de fazê-lo evadir da ação do sistema complemento. (NOGUEIRA et al., 1975)

Já foi demonstrado que moléculas e proteínas produzidas pelo parasita, tanto antes quanto durante o contato com a célula hospedeira, ajuda no sucesso de sua invasão. Exemplos disso são receptores que ativam vias de sinalização como as PI3K, AKT, MAPK que são importantes para a sobrevivência celular, proliferação, crescimento, disponibilidade de nutrientes e outros fatores necessário para a sobrevivência e homeostasia celular tanto do parasita quanto da célula hospedeira (CHUENKOVA et al., 2008; PERRIN, 2008). Várias moléculas têm papel importante nesse processo de migração e adesão à parede da célula alvo. Glicoproteínas de superfície pertencentes à superfamília da transialidase-gp85 permitem a ligação do parasita à fibronectina e lâmina (GIORDANO et al., 1994, 1999), a POP Tc80 age então hidrolisando o colágeno (SANTANA et al., 1997; GRELLIER et al., 2001) permitindo assim a migração do parasita na matriz extracelular. Outras moléculas como a Tc85, gp 83, Tc-1, oligopeptidase e a cruzipaina são importantes nesse processo (ALVES et al., 1986; VILLALTA et al., 2001; AUGUSTINE et al., 2006; BURLEIGH & ANDREWS, 1995; CALER et al., 1998; SCHARFSTEIN et al., 2000; TODOROV et al., 2003).

2.4. Proteína P21

Uma proteína importante que já foi demonstrado o seu papel no processo de internalização do parasita *T. cruzi* é a P21. A proteína P21 foi recentemente caracterizada, sendo secretada por todas as formas evolutivas do parasita e desempenha papel durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicas e amastigotas extracelulares. Já foi demonstrado que a utilização de anticorpos policlonais anti-P21 consegue inibir a invasão celular por formas amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos da cepa G o que não ocorre com a cepa CL. Também pode ser visto que a adição da proteína recombinante trinta minutos antes de colocar os parasitas para invadirem, inibiu a invasão por amastigotas extracelulares de ambas as cepas. Porém, a adição de P21 no mesmo tempo em que os amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos em células HeLa, foi verificado um significativo aumento na invasão celular por ambas as formas evolutivas das cepas G e CL (SILVA et al., 2009). Após a adesão, acredita-se que a P21 (SILVA et al., 2009) secretada na justaposição parasita-célula hospedeira ative uma cascata de sinalização ainda desconhecida que leva a formação de ondas de actina em torno do parasita com ativação da GTPase Rac 1 (MORTARA et al., 2004) e recrutamento de microdomínios enriquecidos em colesterol e GM1 na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2007) bem como mobilização de cálcio dos acidocalciosomas e fosforização de componentes de 87 e 175 kDa no parasita (FERNANDES et al., 2006), culminando com sua internalização. Sendo assim, por meio de controle de expressão gênica, o parasita pode evitar a resposta do hospedeiro induzindo uma maior expressão de proteínas que atuem diretamente na polimerização da actina do hospedeiro favorecendo assim sua internalização e consequente evasão do sistema imune e manutenção da infecção.

Outros estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a P21 pode induzir a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. Além disso, a P21 tem a capacidade de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4; (RODRIGUES et al. 2012).

Assim, diante da diversidade gênica presente no complexo *T. cruzi* e da importância significativa na infecção *T. cruzi*, estudos que visem uma melhor caracterização, tanto gênica quanto genômica da P21 e que considerem sua expressão

diferencial entre as diferentes linhagens fazem necessários para a melhor compreensão e possível controle da infecção pelo *T. cruzi*.

3. **Objetivo:**

3.1. **Gerais:**

Caracterização Genômica da P21 em diferentes cepas de *T.cruzi*

3.2. **Específicos:**

Verificar a similaridade existente entre o gene da mesma proteína nas diversas cepas de *T. cruzi*

Analisar *in silico* o ambiente genômico do gene da proteína P21

Analisar a sintenia presente nos cromossomos em que a sequência gênica da P21 está localizada.

3. Material e Métodos

3.1. Composição de soluções e tampões

Denhart's (50 X): Ficoll 1 %, polivinilpirrolidona 1 %, BSA 1 %

PBS (1 X): NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 2,2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,4

PSG: NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, NaCl 23 mM, glicose 6%, pH 8,0

Solução de pré-hibridização: formamida 50 %, SSC 5 X, Denhardt's 5 X, DNA de esperma de salmão 0,1 mg/mL

Solução de lise para blocos de agarose: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 500 mM, pH 8,0, sarcosil 1 %, proteinase K 1 mg/mL

Solução de lise para extração de DNA genômico: NaCl 150 mM, EDTA 250 mM, proteinase K 100 µg/mL, sarcosil 0,5 %, Tris/HCl 1 M, pH 8,0

Soluções para lavagem das membranas de náilon após hibridização:

Solução 1 – SSC 2 X, SDS 0,1 %, pirofosfato de sódio 0,1 %

Solução 2 – SSC 1 X, SDS 0,1 %, pirofosfato de sódio 0,1 %

Solução 3 – SSC 0,1 X, SDS 0,1 %, pirofosfato de sódio 0,1 %

Soluções para extração de DNA plasmidial:

Solução A – Glicose 50 mM, Tris/HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM

Solução B – NaOH 0,2 M, SDS 1 %

Solução C – Ácido acético glacial 5 M, acetato de potássio 3 M

Soluções para transferência de DNA de géis de agarose para membranas de náilon:

Depuração – HCl 0,25 M

Denaturação – NaOH 0,5 M, NaCl 1 M

Neutralização – Tris 1 M, NaCl 0,6 M

SSC (1 X): NaCl 0,15 M, citrato de sódio 0,015 M, pH 7,0

Tampão de corrida para DNA (6 X): azul de bromophenol 0,25 %, xleno cianol 0,25 %, sacarose 40 %

TBE (1 X): Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0

TE: Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

DMEM (Gibco): acrescido de HEPES 3,57 g/L, NaHCO₃ 3,7 g/L

LB líquido (Luria Bertani): triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5 %

LIT: infusão de fígado 5 g/L, triptona 5 g/L, NaCl 4 g/L, Na₂HPO₄ 8 g/L, hemina 10 g/L, glicose 0,2 %, soro fetal bovino 10 %, pH 7,3

3.2 Culturas de epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (clones CL Brener, cepa CL, 115, Am69, Y e G) foram mantidas em fase logarítmica de crescimento a 28 °C em meio de cultura LIT suplementado com 10 % de soro fetal bovino sem agitação.

3.3 Busca de sequências P21 no banco de dados TriTrypDB

A sequência da proteína P21 de 465 aa (EU004207.1) foi utilizada em buscas no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) para identificação de sequências similares aos genes da P21. Nesta análise, foram consideradas apenas as sequências que apresentaram alinhamento maior que 250 pb e grau de similaridade superior a 70 %. Para a localização das sequências P21 no genoma de *T. cruzi*, foram utilizados como base os cromossomos *in silico* TcChr definidos por Weatherly et al. (2009).

3.4 Construção de mapas genômicos

Para estudo do ambiente genômico da P21, todos os genes presentes cerca de 25 kb a montante e 25 kb a jusante da P21 completa foram anotados de acordo com o banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>). Os mapas genômicos foram construídos com o auxílio do programa DNAMAN (<http://www.lynnon.com>).

3.5 Alinhamento múltiplo de sequências e inferência filogenética

As sequências de aminoácidos das variantes P21 de *T. cruzi* que apresentaram similaridade com proteínas P21 foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e com auxílio do programa MegAlign (DNASstar Inc.) seguido de ajuste manual com o programa GeneDoc.

3.6 Inclusão de DNA genômico de *T. cruzi* em blocos de agarose

Cerca de 2×10^8 epimastigotas (cepa CL e clone CL Brener) foram lavados duas vezes em PBS por centrifugação a $3.000 \times g$ por 5 min, ressuspensos em 1 mL de PBS e homogeneizados com 1 mL de agarose LMT (“Low Melting Temperature”) a 2% preparada em H₂O. Alíquotas de 100 µL desta suspensão, contendo aproximadamente 10^7 parasitas, foram depositadas em formas apropriadas para solidificação da agarose. Os blocos foram incubados em solução de lise a 56 °C por 16 h e lavados 3 vezes com TE. Em seguida, os blocos de agarose foram estocados em EDTA 0,5 M a 4 °C e submetidos a eletroforese de campo pulsado (PFGE).

3.7 Separação das bandas cromossômicas de *T. cruzi* por eletroforese de campo pulsado (PFGE)

Os blocos de agarose contendo DNA cromossômico das cepas foram submetidos à eletroforese de campo pulsado (PFGE) em gel de agarose. Nesse sistema, a posição dos eletrodos determina modificações periódicas da direção do campo elétrico, fazendo com que as moléculas de DNA de grande tamanho se orientem constantemente permitindo o seu movimento entre a malha da agarose. Foi utilizado o aparelho Gene Navigator™ System (Pharmacia) nas condições descritas por Cano et al. (1995). Os géis foram preparados com agarose certificada para PFGE 1,1 % diluída em TBE 0,5 X. As corridas eletroforéticas foram de 132 h a voltagem constante de 80 V a 13 °C. Foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 s por 30 h, 120 s por 30 h, 200 s por 24 h, 350 s por 24 h e 800 s por 24 h, com interpolação. Em cada uma das corridas eletroforéticas foi utilizado como padrão de tamanho molecular o DNA de *Hansenula wingei*, cujas bandas cromossômicas possuem 3,13 – 2,70 – 2,35 – 1,81 – 1,66 – 1,37 – 1,05 Mb. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

3.8 Transferência de DNA contido em gel de agarose para membrana de náilon

As bandas cromossômicas separadas por PFGE foram transferidas para membranas de náilon (GE Healthcare) empregando-se o sistema Vacum Gene XL (Pharmacia). Os géis foram depositados sobre a membrana de náilon e tratados com as soluções de depurinação por 45 min, denaturação por 20 min, neutralização por 20 min e SSC 20 X por 4 h. Após a transferência, as membranas foram irradiadas com luz ultravioleta (150 mJ) para fixação do DNA no aparelho GS Gene Linker™ UV Chamber (Bio-Rad). As membranas foram estocadas a temperatura ambiente até hibridização com a sonda radioativa SAP-CD.

3.9 Marcação de sonda com ³²P

O fragmento correspondente ao domínio central P21 foi purificado com o kit “Wizard SV Gel and PCR clean-up system” (Promega). Para marcação da sonda P21 foi utilizada a técnica de “random-primer”, onde oligonucleotídeos contendo sequências randômicas servem de iniciadoras para a síntese de DNA com a incorporação dos nucleotídeos marcados radioativamente adicionados à reação. Inicialmente, cerca de 100 ng do DNA foram denaturados e incubados com os componentes do sistema “random-primer DNA labelling system” (Life Technologies) e com 40 µCi de [α -³²P] dCTP durante 1 h a 25 °C. A reação foi interrompida com a adição de 5 µL de EDTA 0,25 M, pH 8,0, e o fragmento radioativamente marcado foi purificado com o kit “ProbeQuant G-50 Micro Columns” (GE Healthcare). A radioatividade incorporada foi determinada por espectrometria de cintilação líquida.

3.10 Hibridização das membranas de náilon com a sonda marcada radioativamente

As membranas de náilon foram pré-hibridizadas por 1 h a 42 °C sob leve agitação com solução de pré-hibridização. Após a pré-hibridização, a solução foi substituída pelo mesmo tampão contendo a sonda radioativa P21 denaturada a 100 °C por 5 min. A hibridização foi processada por 16 h a 42 °C com agitação. Após a

hibridização, as membranas foram submetidas a duas lavagens sucessivas de 30 min com “Solução de lavagem 1” a 42 °C. Em seguida, foram submetidas a duas lavagens adicionais de 30 min com “Solução de lavagem 3” a 56 °C e exposição a filmes de raios-X (GE Healthcare) em cassetes com tela intensificadora a –70 °C por 48-72 h. Após a exposição, os filmes de raios-X foram revelados.

3.11 Amplificação da sequência gênica da P21 por PCR

As sequências codificadoras da sequência da P21 foram amplificadas por PCR. As reações foram processadas utilizando como molde 50 ng do DNA do plasmídeo contendo o inserto da P21 ou DNA genômico de cada isolado, 100 pmol de cada um dos primers apropriados, 2 mM de MgCl₂, tampão específico para a enzima diluído para 1 X, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP e H₂O para volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação seguiram a programação abaixo:

94°C por 1'	} 35 ciclos
94°C por 30''	
58°C por 30''	
72°C por 1'	
72°C por 10'	

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 – 1,2% e visualizados sob luz ultravioleta.

Purificação de fragmentos amplificados por PCR

O fragmento amplificado da sequência da P21, foi purificado do gel de agarose com o auxílio do kit “Wizard SV Gel and PCR clean-up system” (Promega).

3.12 Southern Blot

A análise do ambiente genômico de *T. cruzi* foi feita com o auxílio da análise do perfil de restrição gerado por diferentes endonucleases: PvuII, BamHI e EcoRI. O parâmetro utilizado para selecionar as enzimas foi a primeira enzima que cliva a região genômica onde está localizada a sequência da proteína P21 (TcCLB.509767.140). Aproximadamente 5 µg de DNA total das diferentes cepas de *T. cruzi* foi digerido com enzimas de restrição específicas. A digestão foi realizada a 37°C durante 4h. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e posteriormente corados com brometo de etídio (0.5 µg/ml). O gel foi fotografado e transferido para membrana de náilon em tampão SSC 10X concentrado. A membrana foi hibridizada com a sonda marcada com 32P correspondente aos genes.

4. Resultados

4.1. Identificação do gene P21 no genoma de *T. cruzi* por ferramentas de bioinformática

A proteína recombinante P21 foi caracterizada em 2009 por Silva et al., a partir de uma sequência gênica de proteína hipotética disponível no banco de dados do genoma de *T. cruzi*. Essa sequência codifica uma proteína de 21 kDa. Após a sua caracterização a sua sequência de nucleotídeos de 465 pb ficou disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), número de acesso (EU004207.1) e foi utilizada nesse trabalho para buscar sequências similares depositadas no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>). Foram consideradas na análise, todas as sequências que apresentaram alinhamento maior que 250bp e grau de similaridade superior a 70%. Os resultados da busca mostraram a existência de oito sequências gênicas depositadas no banco de dados TriTrypDB (Tabela 1). Entre essas sequências gênicas, duas estão indicadas nos cromossomos considerados homólogos do clone CL Brener, cromossomo TcChr22-S e TcChr22-P. As outras seis sequências encontradas estão no genoma de outras cepas de *T. cruzi* sequenciadas e depositadas no banco de dados do TriTrypDB. Essas seis sequências não estão organizadas em cromossomos *in silico* (TcChr) definidos por Weatherly et al., (2009). A tabela 1 também nos mostra que não foi

encontrado nenhum outro gene ortólogos em outros organismos com genomas sequenciados, como *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. vivax* e nas diferentes espécies de *Leishmania* analisadas (*L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. tarentolae*), denotando uma espécie-especificidade da sequência P21 em *T. cruzi*.

Tabela 1. Sequências do gene da proteína P21 com alta similaridade, encontradas no banco de dados TrityDB.

Número de Acesso (TriTrypDB)	Similaridade		Organismo
	(%)	Tamanho (pb)	
<u>KB205446</u>	99	463/465	<i>T. cruzi</i> strain Esmeraldo
<u>KB851949</u>	99	461/465	<i>T. cruzi</i> Tula cl2
<u>TcCLB.509.767.140</u>	99	461/465	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like
<u>KB851845</u>	95	441/462	<i>T. cruzi</i> Tula cl2
<u>TcCLB.509.601.140</u>	95	441/462	<i>T. cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like
<u>ADWP02000472</u>	94	440/465	<i>T. cruzi</i> Sylvio_X10/1
<u>KB222896</u>	94	440/465	<i>T. cruzi</i> JR cl.4
<u>TcMARK CONTIG 732</u>	82	404/489	<i>T. cruzi marinkellei</i> strain B7

(1) Localização baseada nos cromossomos *in silico* (TcChr) definidos por Weatherly et al (2009).

4.1.1. Análise da sequência gênica por PCR

A busca de similaridade da sequência gênica da P21 em sequências gênicas de outros organismos no banco de dados do TrityDB mostrou que a P21 é espécie-

especificidade. Esse resultado foi confirmado a partir da amplificação gênica por PCR. Conseguimos amplificar a sequência gênica da P21 em *T. cruzi* (clone CL Brener, cepa CL, G, Y, 115, Am69) e *T. cruzi marinkellei*, porém a mesma sequência não foi amplificada em *L. amazonensis*, *T. rangeli*, *T. cornohinni* e *T. dionisii* (figura 3). A amplificação do gene também não ocorreu em *T. cruzi marinkellei* uma subespécie de *T. cruzi* (subgenero *Schizotrypanum*) prevalente entre morcegos das Américas Central e do Sul (ZINGALES et al.,2012).O fato de não ter havido amplificação do gene da P21 em *T. cruzi marinkellei* pode ser explicada pelo mal anelamento dos iniciadores com o DNA genômico de *T. cruzi*. Para testar essa hipótese, foi feito alinhamento dos pares de iniciadores utilizados para amplificar a P21 com a sequência homóloga da mesma presente no genoma de *T. cruzi marinkellei* e disponível no TriTrypDB (figura 4). Foi observado que não ocorreu o anelamento dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene da P21 com a sequência de *T. cruzi marinkellei* (TcMARK_CONTIG_732) encontrada na análise de similaridade apresentada na Tabela 1. Por outro lado, existia também a possibilidade da sequência existente no banco de dados não ser suficientemente similar ao gene da P21, pois quando comparado entre as outras sequências observadas na Tabela 1, *T. cruzi marinkellei* é o isolado com menor similaridade (82% - 404bp/489bp). Para testar essa hipótese foi feito a análise do alinhamento das sequências preditas de aminoácidos de todas as variantes da P21 consideradas com alta similaridade apresentadas na tabela 1 (figura 5). O alinhamento dos aminoácidos mostrou que mesmo com poucas variações nas sequências de seus peptídeos, a proteína P21 é conservada entre as cepas e clone de *T. cruzi* sequenciados, inclusive de *T. cruzi marinkellei*, assegurando a alta similaridade. Ainda foi observado que com o alto grau de similaridade entre as sequências, pode se notar que a sequência de aminoácidos preditas em *T. cruzi marinkellei* (TcMark_CONTIG_732) organiza-se de maneira continua, sem um intervalo entre o 32º e 44º aminoácido da proteína, o que não ocorre na sequência de aminoácidos da proteína dos outros isolados. Além disso, as sequências encontradas no cromossomo TcChr22-P do clone CL Brener e em *T. cruzi* Tula cl2 (KB851845) existe uma extensão a mais contendo 25 aminoácidos.

4.1.2. Conteúdo gênico da região genômica da P21

Recentemente, *contigs* e *scaffolds* do clone CL Brener (isolado referência do projeto genoma do *T. cruzi*) foram montadas em 41 plataformas provisoriamente nomeados como cromossomos (TcChr) (WEATHERLY et. al, 2009) . Para melhor entender a localização da sequência gênica da proteína P21 nos cromossomos TcChr22-S e TcChr22-P foi analisado conforme anotações no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) o conteúdo das regiões genômicas de 50 kb que flanqueiam a sequência da P21 completa. No total, foram analisados 41 segmentos genômicos distribuídos pelos cromossomos TcChr22-S e TcChr22-P do clone CL Brener (figura 6). Foi observado que há variações no ambiente genômico da sequência P21. 15 genes encontrados no *contig* do cromossomo TcChr22-S codificam proteínas que estão caracterizadas como "Hypothetical protein" e 6 genes que codificam proteínas hoje já caracterizadas como: "Vesicle transport v-SNARE 11", "Exosome component CSL4", "Alanine Racemase" e "Vacuolar Proton Translocating ATPase subunit A". Em contrapartida, 24 genes foram encontrados no cromossomo TcChr22-P codificando proteínas consideradas hipotéticas, totalizando 88% dos alelos, e apenas 2 genes codificam proteínas hoje conhecidas além da P21, que são: Proteína Tranlocadora de Prótons Vacuolar ATPase e EXOSC1, as mesmas encontradas no *contig* TcChr22-S.

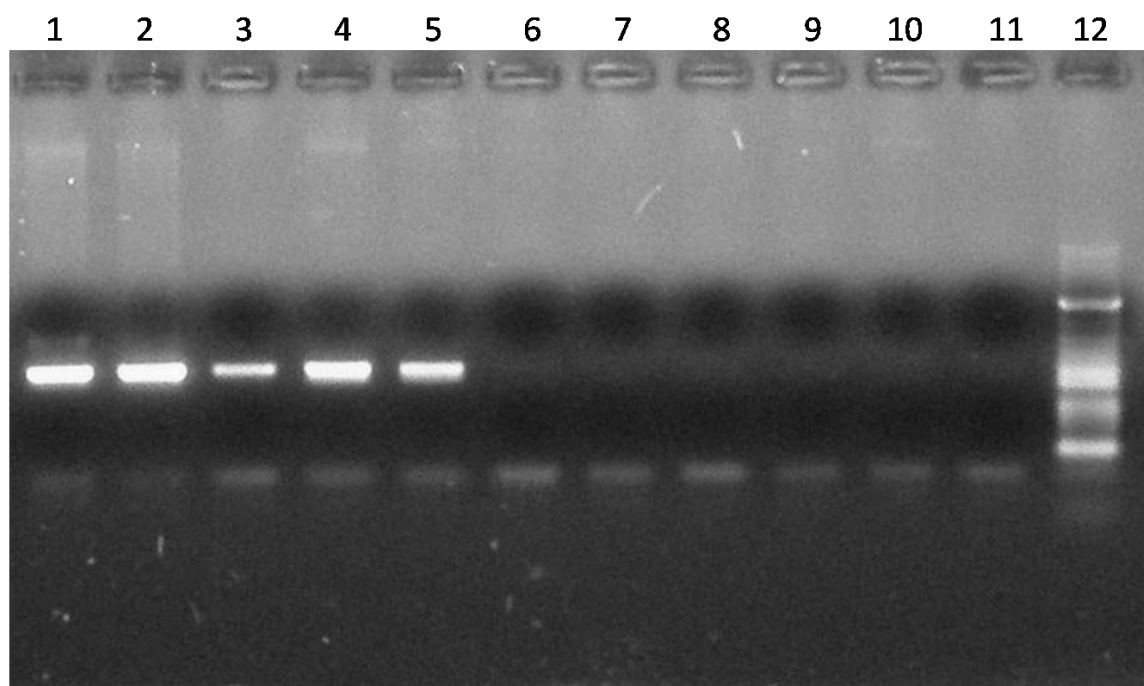


Figura 3 - Amplificação da sequência gênica da P21 em isolados de *T. cruzi* em gel de agarose. 1 a 6: clone CL Brener, CL, G, Y, 115 e *T. cruzi marinkellei*; 7 a 10: *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. dionisi*, *Leishmania* sp., 11: controle negativo, 12: controle de qualidade do DNA genômico de *T. cruzi marinkellei*.

```

CL Brener      :ATGCGATTGTTTTTTTCTCTCTCGTCCTTTTCTCGCCTGCAGCGTGTGGCCGAGGAGGTGGTGAATCGGGGATACAACCACAAGGAGCCCCATAAACGCCACCATCAATCT:114
TcMARK_CONTIG-732:ATGCGGTTTGTGTTTTATTCTCTCTCGTCTTTTTCTCGCCTCCAGCGTGTGGCCGAGGAGTTGACGAGCGGGGCTTACAACCACAAGGAGTTCCATAAGCCCCACCACCATCAT:114
               Primer:GCGCGCTCATATGGAGGTGGTGAATCGGGG

CL Brener      :TTTGGACGCCATCGTCA TGTGCGCAGGGAAGAAATGAGGAATGCGACGGGGGTGGGATGCAGAGGAGAGATAAATTCGGTACTGCCAAACCCCGTCACCGGCTTCTACGAGTAC:228
TcMARK_CONTIG-732:CATCATCAATCCTTTGGACACCGTTATCATCATTATCATCATGTGCGTAGGGAAGAGACAAGGAAGGCGACAGAGGAGGGATGTAGAGGAGAAATCAATCGGTATTGTCAAATC:228

CL Brener      :TGGTGGAAAGTGCTTTCCGAAAAATATGGACCGGTTT CAGCACGCCCGACTGCCAGACGTACATAAATGGCATGATTGCCTGCAGGAACCTTTACCGTTTCTTCTACGGTCCAGGG:342
TcMARK_CONTIG-732:CCCATCAACGGCTTTTATGAGTACTGGTGGAAATGTCTGTACGACAAATATGGACCGGTTT CAGTACATCCGACTGTCAGACGTACATAAATGGTATGATTGCCTGCAGGAACCTTT:342

CL Brener      :GAGCAGTCTCCAGACGGGTGGTGAAGCACCTGCTTCATT CAGAAAACGAGTGGATCCCCAAGGAATGCAGGAACCTCCAGATTCTACAAAGATGCCGTGGTTGGATTCCACAGA:456
TcMARK_CONTIG-732:ACCGTTTCTTTCTACGGTCCAGAAGAACAGTCTCCACATGGGTGGTGAAGTACCTGCTTCAATCAGAAAACGAGTGGATTCTTACCGAATGCAGAACTCCAGATTTTACAAA:456
               Primer:GGAATCTTACT

CL Brener      :CGCCAGTAACGCCTCGGAATGGGGGGATTCTTACGGCTGCAGGAGAGGAGAGAGAGGCGGCCTGACAACGTATGGAAAAATGA-----:543
TcMARK_CONTIG-732:TATGCCGTGCTTGGATTCCACAGACGCCGTAACACCTCAAAATGAGGGATTTTCATGGCTGCAGGTGAGGAAGAAAGAAGGCAGCCTGACAAC:551
               GGCGTCTGTGGAATCC

```

Figura 4 - Alinhamento das variantes do gene da proteína P21 depositadas no banco de dados do clone CL Brener de *T. cruzi* pelo programa MegAlign (DNASTAR). As sequências depositadas no banco de dados TriTrypDB, TcCLB.509767.140 (TcChr22-S) e TcMARK_CONTIG_732, foram deduzidas a partir das fases de leitura aberta dos genes depositadas pelo Projeto Genoma de *T. cruzi*. Em preto estão indicados os resíduos com 100% de identidade, em cinza escuro e cinza claro estão anotados os resíduos com 80% e 60% de identidade, respectivamente. A posição dos oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificar os clones está mostrada com asteriscos abaixo do alinhamento.

TcChr22-P	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVKRGYKHKEPHN----CHHSFGH-----HRHVRREELRLATEVVGCRGEITRYCQPPVNGFYBIDWWKCLSDNMDR	87
TcChr22-S	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVNRGYNHKEPHK-----RHHQSFGH-----HRHVRREEMRNATGVGCRGEITRYCQTPVTGIFYEYWWKCLSENMDR	87
TcMARK_CONTIG_732	MRFVFVLLVLFLASSVSABEELTRRGYNHKEPHKPHHHHHHSFGHRYHHYHVRREELRLKATEEGCRGEINRYCQIPINGFYEYWWKCLYDNMDR	95
ADWP02000472	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVKRGYNHKEPHK-----RHHQSFGH-----HRYVRREELRLATEVVGCRGEITRYCQPPVNGFYBIDWWKCLSDNMDR	87
KB205446	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVNRGYNHKEPHK-----RHHQSFGH-----HRHVRREEMRNATGVGCRGEISRYCQTPVTGIFYEYWWKCLSENMDR	87
KB222896	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVKRGYNHKEPHK-----RHHQSFGH-----HRYVRREELRLATEVVGCRGEITRYCQPPVNGFYBIDWWKCLSDNMDR	87
KB851845	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVKRGYKHKEPHN----CHHSFGH-----HRHVRREELRLATEVVGCRGEITRYCQPPVNGFYBIDWWKCLSDNMDR	87
KB851949	MRFVFVLLVLFLACSVSABEVVNRGYNHKEPHK-----RHHQSFGH-----HRHVRREEMRNATGVGCRGEITRYCQTPVTGIFYEYWWKCLSENMDR	87

TcChr22-P	FRTEDCQTHINGMIACRNEAVSSYGPEEQSPDGLVKHLLHSEKESIPSECRNSRFYKDAVVGYHRRQQRPGMGFFTAAGEEERRQPDNCVK-	179
TcChr22-S	FSTEDCQTYINGMIACRNETVSSYGPEEQSPDGLVKHLLHSEKESIPNECRNSRFYKDAVVGFHRRQ-----	154
TcMARK_CONTIG_732	FSTSDCQTYINGMIACRNETVSYGPEEQSPHGLVKYLLQSEKESIPTECRNSRFYKYAVLGFHRRR-----	162
ADWP02000472	FSTEDCQTHVNGMIACRNEAVSSYGSGEQSPDGLVKHLLHSEKESIPSECRNSRFYKDAVVGFHRRQ-----	154
KB205446	FSTEDCQTYINGMIACRNETVSSYGPEEQSPDGLVKHLLHSEKESIPNECRNSRFYKDAVVGFHRRQ-----	154
KB222896	FSTEDCQTHVNGMIACRNEAVSSYGSGEQSPDGLVKHLLHSEKESIPSECRNSRFYKDAVVGFHRRQ-----	154
KB851845	FRTEDCQTHINGMIACRNEAVSSYGPEEQSPDGLVKHLLHSEKESIPSECRNSRFYKDAVVGYHRRQQRPGMGFFTAAGEEERRQPDNCVKK	180
KB851949	FSTEDCQTYINGMIACRNETVSSYGPEEQSPDGLVKHLLHSEKESIPNECRNSRFYKDAVVGFHRRQ-----	154

Figura 5- Alinhamento das sequências preditas de aminoácidos de todas as variantes da P21 consideradas com alta similaridade apresentadas na tabela 1 programa MegAlign (DNASTAR). As sequências depositadas no banco de dados TriTrypDB TcCLB.509767.140 (TcChr22-S), TcCLB.509601.140 (TcChr22-P), TcMARK_CONTIG_732, ADWP02000472, KB205446, KB222896, KB851845, KB851949. Foram deduzidas a partir das fases de leitura aberta dos genes depositadas pelo Projeto Genoma de *T. cruzi*. Em preto estão indicados os resíduos com 100% de identidade, em cinza escuro e cinza claro estão anotados os resíduos com 80% e 60% de identidade, respectivamente.

4.1.3. Análise do conteúdo gênico da região genômica da P21

Para confirmar os dados obtidos na análise dos cromossomos *in silico*, foi feito a busca no banco de dados, enzimas que clivariam regiões específicas dentro desse ambiente genômico estudado, para confirmar o perfil heterogêneo dessa região. Posteriormente feito um Southern blot com o DNA genômico do clone CL Brener, cepas CL, G, Y e 115 de *T. cruzi*. Os dados fornecidos pelo TrityDB permitiu escolher as enzimas (PvuII, EcoRI e BamHI) e calcular qual seria o tamanho de bandas previsto depois do processo de digestão em que a sequência P21 estaria (Figura 7). O DNA digerido pelas enzimas PvuII, EcoRI e BamHI foi separado por eletroforese em gel de agarose e posteriormente feito hibridização com a sonda radioativa da P21 e comparado o tamanho das bandas entre os isolados. Os resultados nos mostra que há a formação de bandas de tamanhos distintos entre os isolados mostrando uma variação na estrutura do cromossomo onde o gene da proteína esta localizada ou uma variação de nucleotídeos (Figura 7). Quando o genoma foi clivado com a enzima PvuII, a cepa CLB e G mantem um padrão semelhante de digestão, formando bandas com tamanho de 4kb, enquanto que em Y e 115 não ocorre a mesmo perfil, formando duas bandas de tamanhos diferentes, 5,7Kb – 4,2 Kb e 5,7Kb e 4,0 Kb respectivamente. Quando usado EcoRI o padrão de digestão muda em todas as cepas. O clone CL Brener e a cepa G continuam hibridizando apenas uma banda com mesmo tamanho, 8Kb e as cepas Y e 115 hibridizam apenas uma banda com o mesmo tamanho quando comparada entre elas, 5,7Kb. Mesmo ainda o padrão tendo mudado em relação ao uso da enzima PvuII, pode-se notar que CL Brener e G seguem padrão de bandas semelhantes assim como as cepas Y e 115. Quando foi utilizado a enzima BamHI foi visto que o perfil de digestão mudou novamente porém agora todas os isolados apresentaram o mesmo tamanho de banda, 11,3 Kb. Esses resultados mostram que o gene da P21 está inserido em uma região cromossômica que sofreu mudanças no processo de surgimento desses diferentes isolados e corroboram com todos dados fornecidos pelo TrityDB.

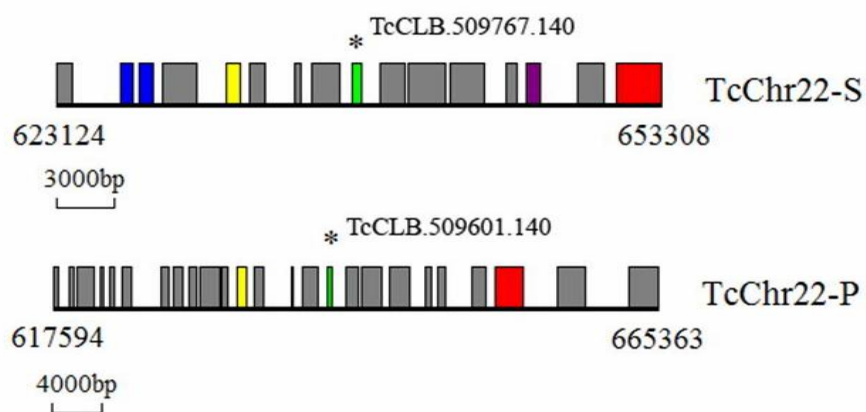


Figura 6 – Ambiente genômico da proteína P21 nos cromossomos TcChr22-S e TcChr22-P. A figura ilustra o conteúdo das regiões genômicas de 50 kb que flanqueiam a sequência da P21 completa. Os blocos coloridos representam genes presentes nesse ambiente genômico. Em vermelho Vacuolar Proton Translocating ATPase subunit A; roxo: Alanine Racemase; cinza: Hypothetical protein; amarelo: Exosome component CSL4; azul: Vesicle transport v-SNARE 11 e verde o gene da proteína P21

4.1.4. Determinação do Cariótipo

Bandas cromossômicas foram separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio (Figura 8). Referimo-nos a uma banda de DNA em PFGE aquela visível após coloração com brometo de etídio. Esta pode conter um, dois ou mais cromossomos não necessariamente homólogos. As bandas cromossômicas de CL Brener foram numeradas com algarismos romanos (I- XX) e G e Y com algarismos arábicos (G: 1-19 e Y: 1-21), como descrito em estudos anteriores (Vargaset. al, 2004; Cano et. al, 1995). Para a determinação do cariótipo da cepa 115, suas bandas foram numeradas com algarismos arábicos, começando com a menor faixa (Figura 8). Os padrões de cariótipo são homogêneos dentro dos grupos Tc II (cepa Y) e VI (cepa CL e clone CL Brener). Ele é composto por 19-22 bandas com tamanhos que variam 3,27-0,5 Mb. Como relatado por (PEDROSO et. al, 2003; Vargaset. al, 2004), os cariótipos de TC II e VI são geralmente diferentes dos isolados TcI (cepa G e clone Dm28c) e analisando a cepa 115 nota que pode ser considerado que também em geral os cariótipos de Tc II e VI podem ser diferentes dos isolados de Tc V. Em cepa G (Tc I) seu cariótipo possui dezenove bandas que vão 0,53-2,83 Mb, e em 115 TcV foi observado dezoito bandas que variam entre tamanho de 0,57 a 2.58 Mb. O cariótipo molecular da cepa 115 ficou, portanto, composto de 18 bandas cromossômicas: 13 bandas megabase variando 3.28-1,04 Mb e 5 bandas intermediárias entre 0,97 e 0,63 Mb. O tamanho e o número de bandas cromossômicas na cepa 115 foram menores do que as identificadas nos isolados dos grupos TC II e VI porem a distribuição de suas bandas não houve muita diferença visível.

Definimos polimorfismo como sendo a comparação de dois ou mais cromossomos entre indivíduos de uma mesma espécie, que apresente tamanhos diferentes (PFEIFFER et al., 2000). A maioria dos polimorfismos no comprimento dos cromossomos foi de pequenas amplitudes quando comparado o cariótipo da cepa 115 em relação ao cariótipo dos outros isolados, e há a ausência de três bandas na cepa 115 que pode estar correlacionada com a presença de uma nova banda migrando acima ou abaixo desta posição. Em comparação com CL Brener, as bandas mais polimórficas foram bandas XV (1.65, Mb), XII (1.35 Mb), II (0.58) e I (0.51) , que não foram encontradas na cepa 115, mas em contra partida as bandas 13 (1.88 Mb) e 12 (1.72 Mb)

não aparece no cariótipo de CL Brener. Isso sugere a ocorrência de fusão ou fissão cromossômica, o que justifica o aparecimento ou não de bandas no cariótipo, mas para confirmar tal hipótese são necessários outros experimentos. E por fim, quando analisado o cariótipo do isolado SO3 (Tc V) (LIMA, 2012; SOUZA et al., 2011) também pertencente ao mesmo grupo da cepa 115, o cariótipo se difere do SO3.

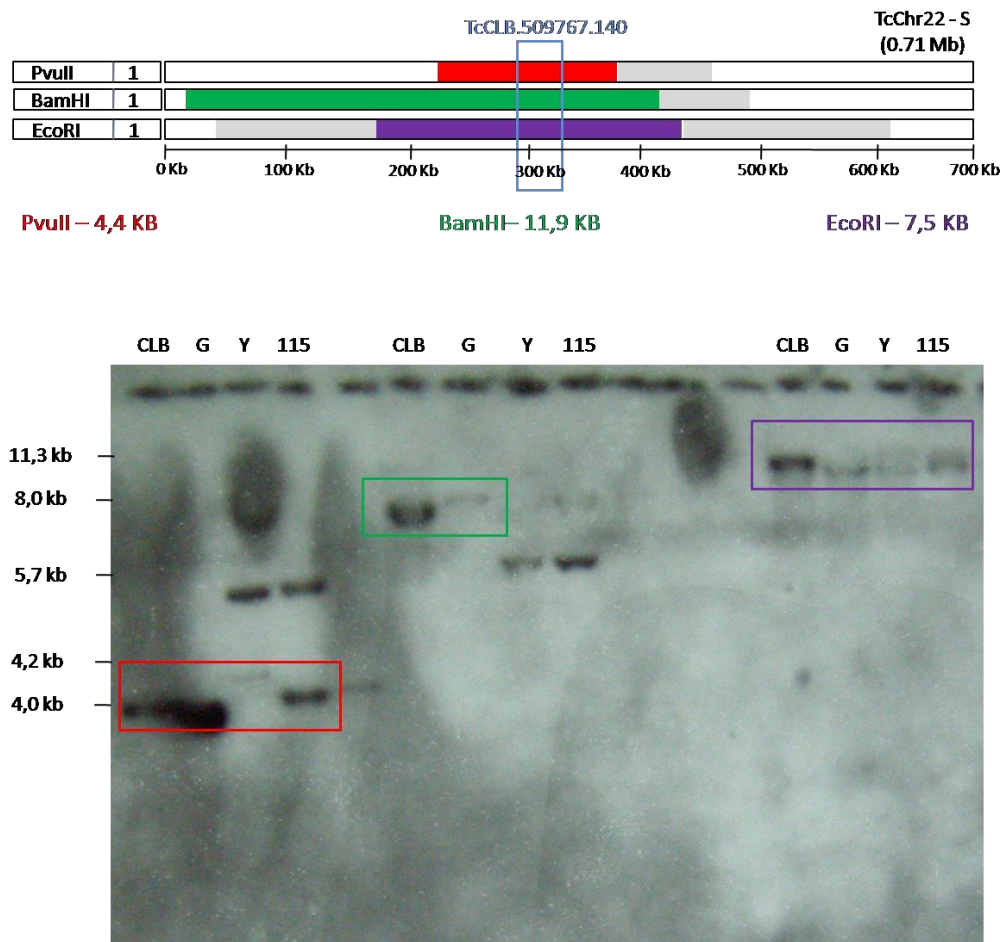
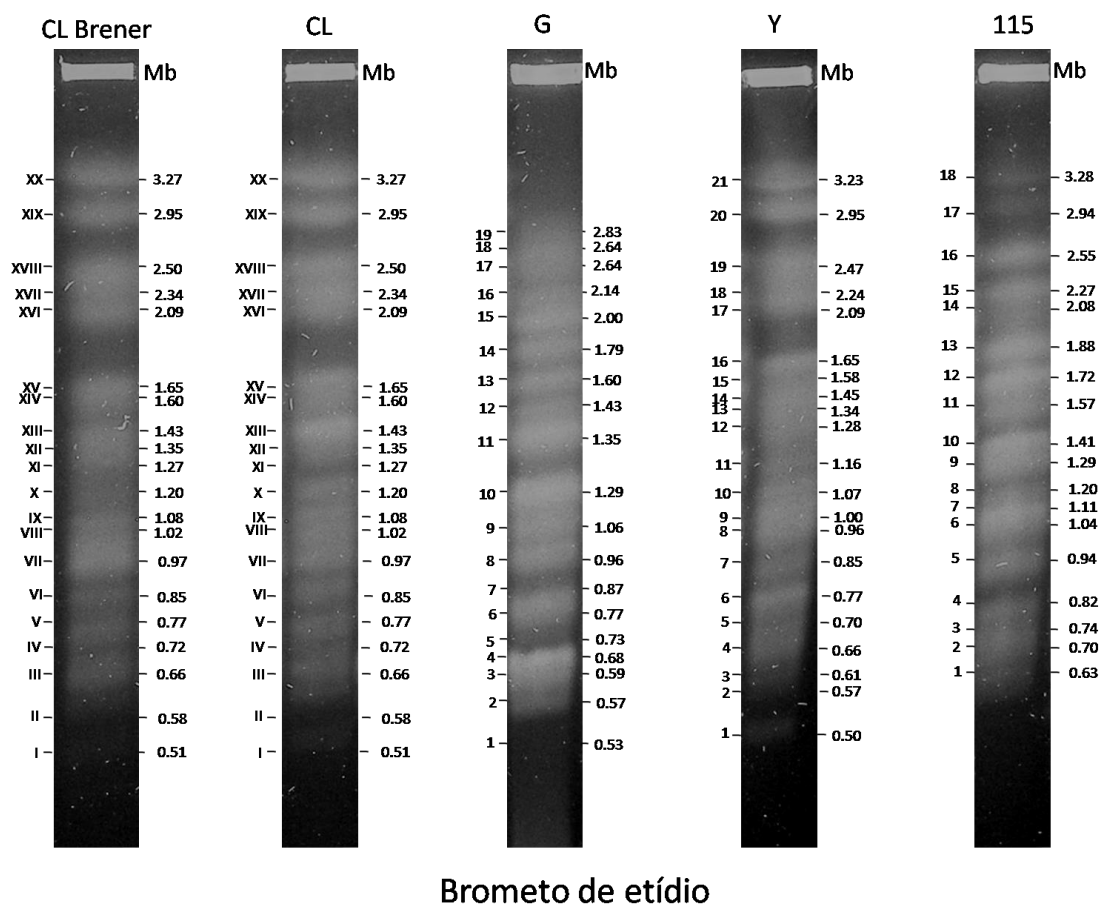


Figura 7 - Perfil de restrição in silico dos cromossomos TcChr22-S in silico de *T. cruzi* utilizando diferentes enzimas de restrição (BamHI, PvuII e EcoRI) e Perfil de restrição em DNA genômico de isolados de *T. cruzi* (CL Brener, G, Y e 115) pelas enzimas PvuII, EcoRI e BamHI separado por eletroforese em gel de agarose e posteriormente feito hibridização com a sonda radioativa da P21. “Digestão in silico” dos cromossomos Tc-Chr22-S (A); vermelho indica o perfil de restrição esperado quando utilizado a enzima PvuII, verde indica o perfil de restrição esperado quando utilizado a enzima BamHI e roxo indica o perfil de restrição esperado quando utilizado a enzima EcoRI. Logo abaixo dos cromossomos está representado o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos coloridos pelas respectivas cores correspondem a fragmentos que obtiveram sinais positivos com a sonda no “Southern blot” e os cinzas que obtiveram sinal negativo. Digestão em DNA genômico de isolados de *T. cruzi* (CL Brener, G, Y e 115) (B); Caixas em vermelho localização da banda clivada pela enzima PvuII, verde indica a localização da banda cliva pela enzima BamHI e roxo indica a localização da banda cliva pela enzima EcoRI.



Brometo de etídio

Figura 8 - Polimorfismo dos cariótipos de isolados das linhagens de *T. cruzi*. As bandas cromossômicas foram separadas por “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) e coradas com brometo de etídeo. As bandas cromossômicas do clone CL Brener foram numeradas em algarismos Romanos (I – XX) e cepas G e Y com algarismos arábicos (1-19 e 1-21 respectivamente), como descrito em (Vargaset. al, 2004; Cano et. al, 1995, Lima, 2011 e Souza et al., 2011). As bandas da cepa 115 foram numeradas com algarismos arábicos começando pela banda de menor tamanho, como foi determinado para o clone CL Brener (Cano et. al, 1995).

possui 22 bandas que variam entre 0.50 a 3.27 Mb, com pouco polimorfismo entre o comprimento dos cromossomos. Esses autores ainda mostram que o cariótipo do isolado D11, clone da cepa G, apresentou distribuição cromossômica diferente da sua linhagem parental e mostrou que cepas no mesmo grupo e até mesmo clones podem sofrer variações em seu conteúdo gênico e cariótipo molecular. Este perfil de cariótipo mostrado para a cepa 115 são reprodutíveis e foram obtidas repetidas vezes em nosso laboratório.

4.1.5. Análise da sintonia e rearranjos cromossômicos por hibridização com sonda P21

Os marcadores moleculares partilhados entre os cromossomos e organizados na mesma ordem foram utilizados para definir regiões de homologia cromossômica. Para examinar o nível de sintonia entre o clone CL Brener e as cepas CL, G, Y e 115, transferências de Southern foram realizadas e os cromossomos separados por PFGE foram hibridizados com marcadores genéticos previamente mapeados para o cromossomo 22 (bandas: XV-1.65 Mb e IX-1.08 Mb) do clone CL Brener. Os resultados apresentados mostram que, em todos isolados, os cromossomos com o gene da proteína P21 mantiveram a sintonia. A análise global mostrou padrões de hibridação semelhantes entre os isolados CL Brener, CL, Y e G, porém o mesmo padrão não se manteve na cepa 115 (Figura 9). CL Brener, CL, Y e G foram hibridizados com duas bandas (1.65 e 1.08 Mb; 1.65 e 1.08 Mb; 1.65 e 1.16 Mb; 1.29 e 0.96 Mb respectivamente), e a cepa 115 com apenas uma banda (1,04 Mb).

A co-localização destes marcadores com duas bandas cromossômicas em CL Brener, CL, G e Y pode ser explicada pela existência de dois cromossomos homólogos de tamanhos diferentes ou pela ocorrência de um grande evento de duplicação que compreende as regiões 1.08 Mb e 1.65 Mb de dois cromossomos não homólogos. Em contrapartida, o fato de os marcadores do TcChr22 e a sonda P21 ter hibridizado a mesma banda de 1.04 Mb da cepa 115 indica a presença de dois cromossomos homólogos de mesmo tamanho. As marcações ocorridas em uma ou mais bandas de

tamanho molecular semelhante como ocorreu nos isolados CL Brener e CL (XV - 1.65 Mb) e cepa Y (banda 16 - 1.65 Mb), indicam que estes são de fato cromossomos.

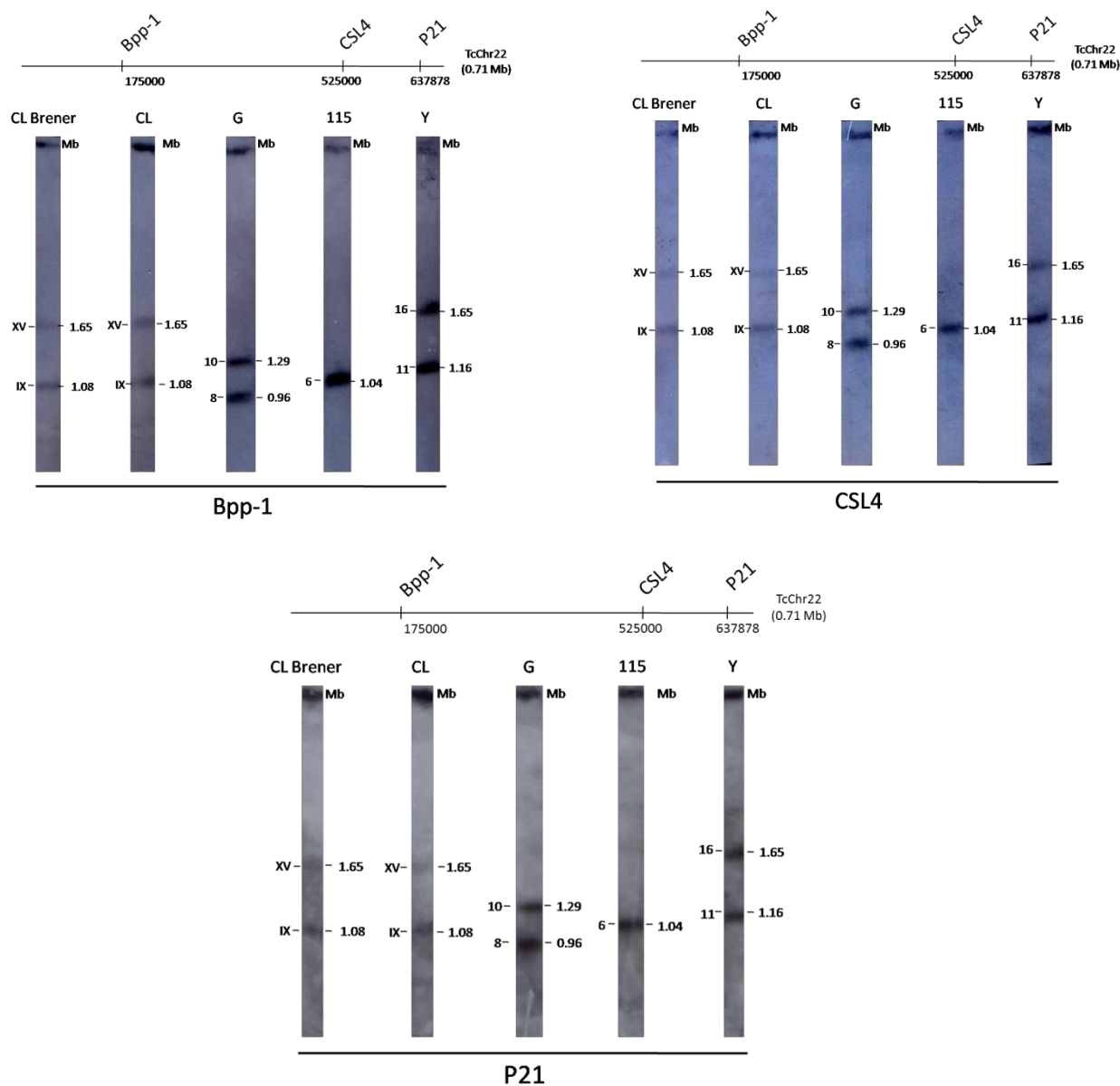


Figura 9 - Mapeamento dos marcadores específicos do cromossomo *in silico* TcChr22 (Bpp-1 e CSL4) e Sonda P21 para análise de sintenia. A imagem mostra que em todos isolados os cromossomos com o gene da proteína P21 mantiveram a sintenia. Os marcadores pertencem ao cromossomo TcCh22 *in silico*. As posições dos marcadores utilizados como sondas marcadas radioativamente são indicados na representação esquemática dos cromossomas *in silico*.

homólogos (LIMA, 2013; SOUZA et. al, 2011). Como já citado, a cepa referência para o projeto genoma é CL Brener e quando comparado as marcações ocorridas entre as cepas Y e G observamos uma diferença no tamanho das bandas que esta localizado a sequência da P21, variando de 360k para as bandas XV e 10 e 120k para as bandas IX e 8 (Figura 10 e 11). Esses dados sugerem que a sequência da P21 está localizada em um cromossomo que sofreu alguma perda em seu conteúdo gênico. Quando a mesma comparação é feita com a cepa 115, observamos que além da ocorrência de redução de material genético ter acontecido, ocorreu também o rearranjo entre os cromossomos homólogos formando cromossomos de mesmo tamanho (Figura 12).

Foi observado também que a diferença existente entre o tamanho dos cromossomos dos isolados é pequena - até 0.69 Mb - sugerindo a ocorrência de pequenos rearranjos no cromossomo onde está localizado o sequência da P21. E por fim, a hibridação de sondas localizadas nas extremidades opostas do cromossomo 22 com os marcadores Bpp-1, CSL4 e com a sonda P21 confirmou a conservação destes grupo de ligação entre os isolados analisado.

Para corroborar os resultados obtidos, foi feito a construção do cromossomo 22 (S e P) da cepa referência do projeto genoma (CL Brener) e comparado à região gênica da P21 com a mesma região gênica de outros dois isolados (Sylvio X10/1 e *T. cruzi marinkellei*) que possuem a alta similaridade disposta na tabela 1. O alinhamento teve o objetivo de analisar a estabilidade gênica da P21 nos *contigs* e cromossomos de *T. cruzi* (figura 13). Esse alinhamento permitiu observar regiões sintênicas e não sintênicas como já explicado no início dessa sessão. A comparação entre esses cromossomos identificou pouca inversão de segmentos envolvendo o cromossomo TcChr22 (S e P) . Como já citado, mesmo os cromossomos TcChr 22 (S e P) sendo de tamanhos diferentes eles são considerados homólogos. A sequência da P21 está situada próxima a uma região telomérica (posição de 639 Kb) e quando comparada essa região com os *contigs* dos outros isolados, nota-se que não foi identificado quase nenhuma inversão dos segmentos envolvidos nesse *contig* de *T. cruzi marinkellei* e o mesmo pode se afirmar para Sylvio X10/1. O segmento terminal de TcChr22 (média de 180 kb) corresponde a região total do *contig* de *T. cruzi marinkellei* e poucos segmentos formam deslocados para o início do cromossomo 22. Embora não tenha havido montagem, entre

estes *contigs* analisados, no banco de dados, podemos inferir que eles podem pertencer ao mesmo cromossomo, pois mantém visivelmente a sintenia de quase toda a região do *contig*.

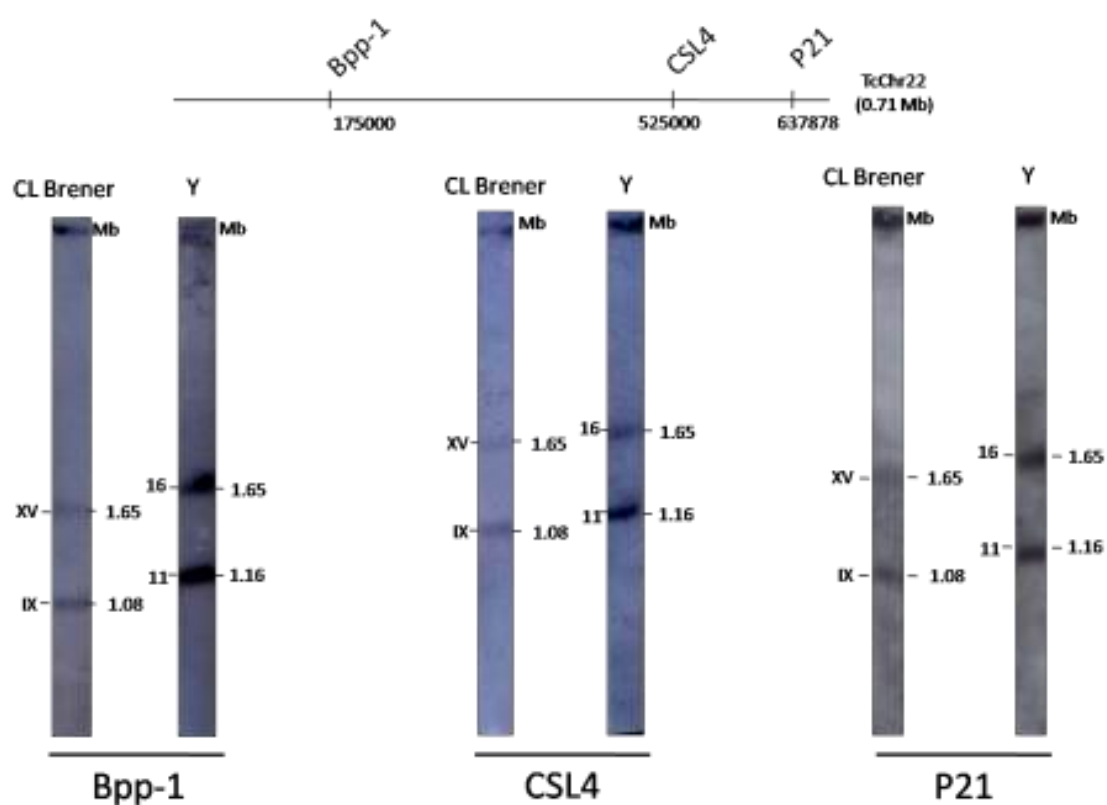


Figura 10 - Identificação de possíveis cromossomos homólogos na cepa Y. Os marcadores pertencem ao cromossomo TcCh22 *in silico*. Identificação de possíveis cromossomos envolvendo duas bandas na cepa G e duas bandas na clone CL Brener. As posições dos marcadores utilizados como sondas marcadas radioativamente são indicados na representação esquemática dos cromossomas *in silico*. Marcadores são BPP-1; CSL4 e P21.

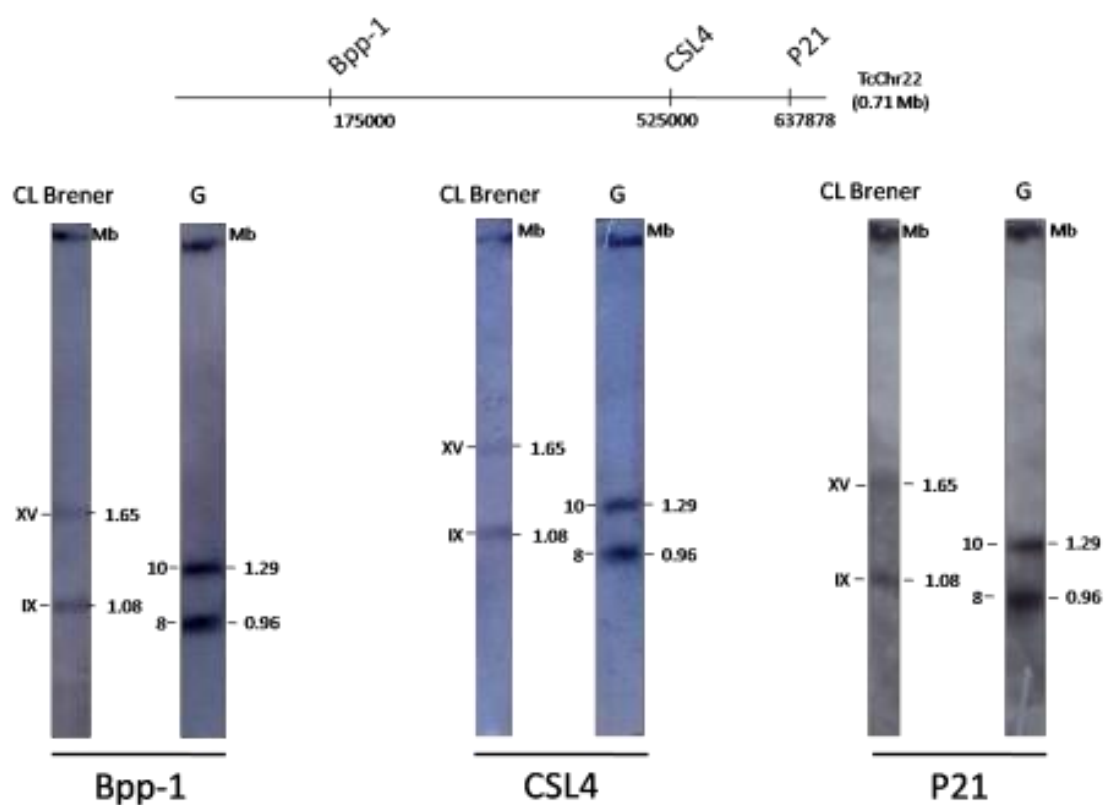


Figura 11 - Identificação de possível polimorfismo no tamanho cromossômico na cepa G. Os marcadores pertencem ao cromossomo TcChr22 *in silico*. Identificação de polimorfismo no tamanho do cromossomo envolvendo duas bandas na cepa G e duas bandas na clone CL Brener. As posições dos marcadores utilizados como sondas marcadas radioativamente são indicados na representação esquemática dos cromossomas *in silico*. Marcadores são BPP-1; CSL4 e P21.

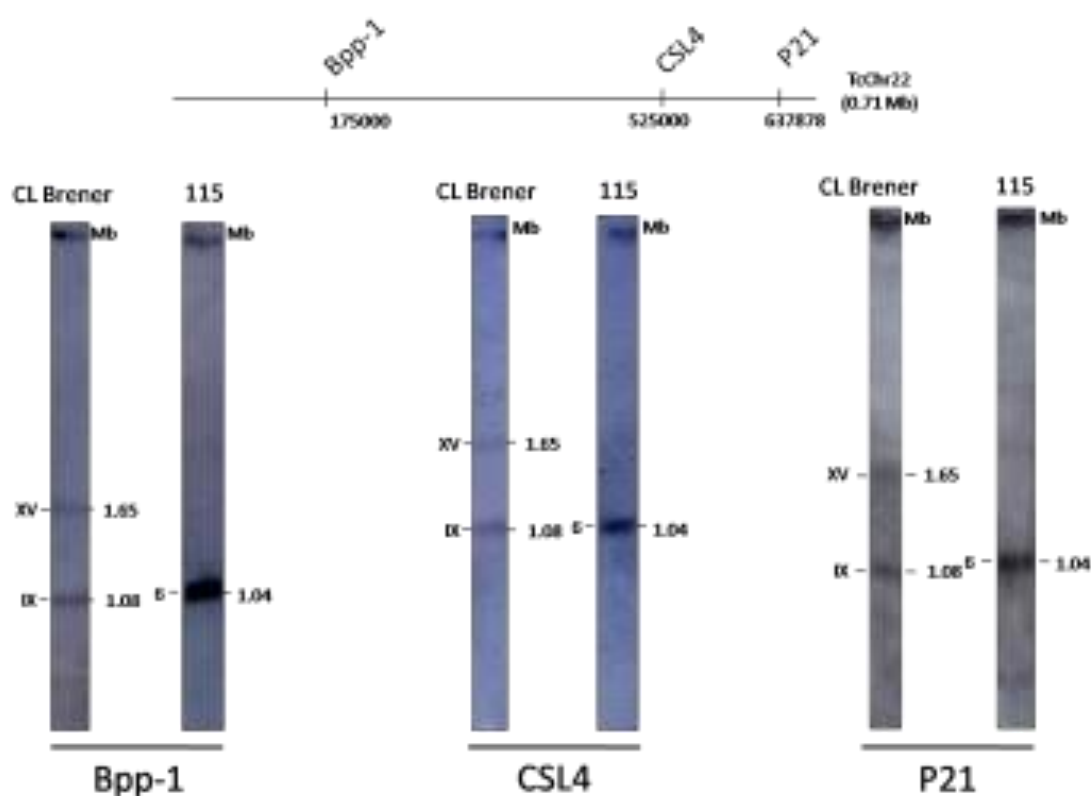


Figura 12 - Identificação de possíveis rearranjos cromossômicos na cepa 115. Os marcadores pertencem ao cromossomo TcChr22 *in silico*. Identificação de rearranjos envolvendo uma banda na cepa 115 e duas bandas na clone CL Brener. As posições dos marcadores utilizados como sondas marcadas radioativamente são indicados na representação esquemática dos cromossomas *in silico*. Marcadores são BPP-1; CSL4 e P21

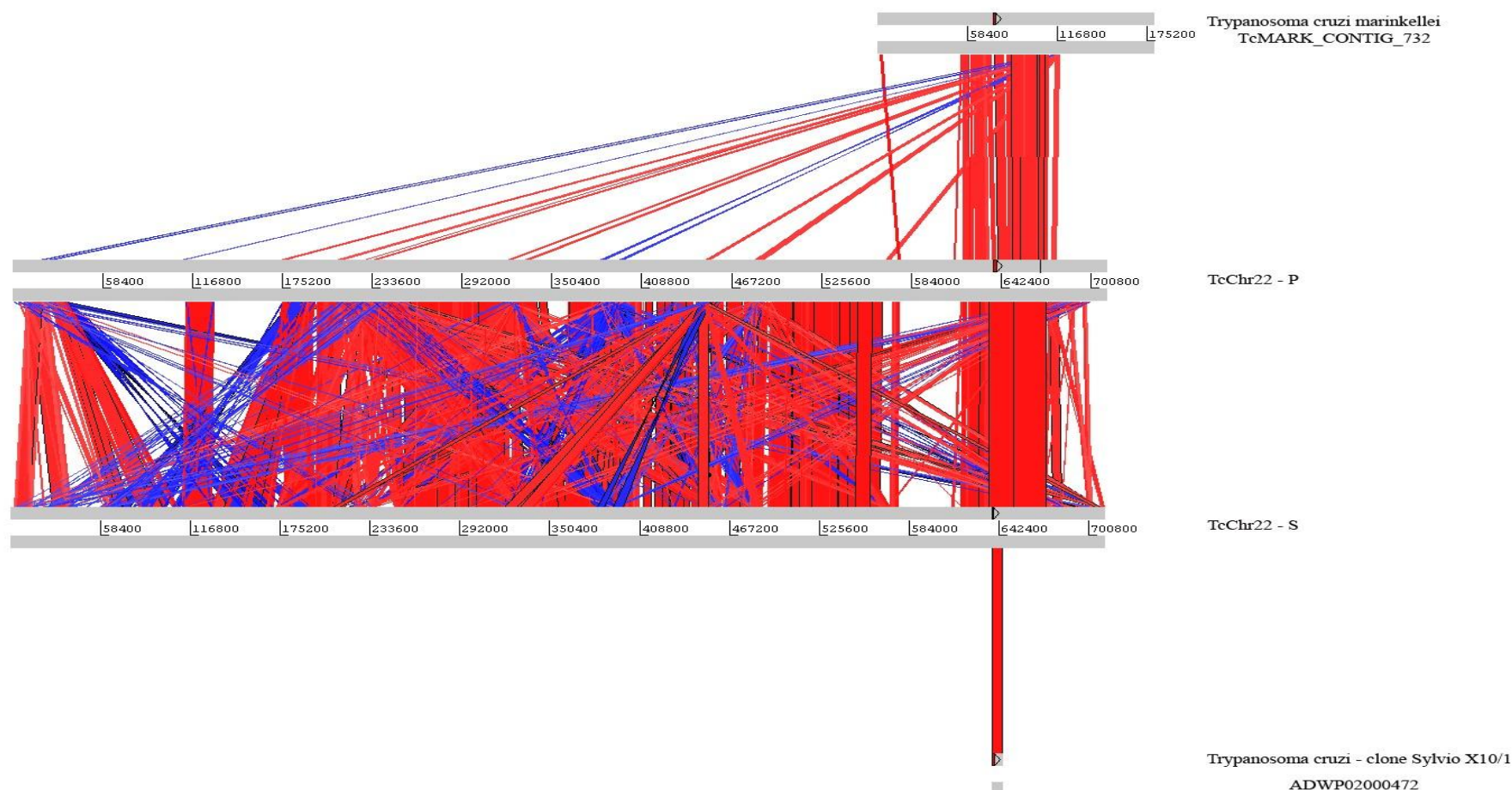


Figura 13 - Alinhamento entre regiões genômicas homólogas de *T. cruzi* *in silico*, cromossomos TcChr22 (S e P) e contigs TcMARK_CONTIG_732 () e ADWP02000472 (Sylvio X10/1). Comparação entre TcChr22 (cromossoma " P " atribuída ao haplótipo não Esmeraldo e " S " para o haplótipo Esmeraldo) e TcMARK_CONTIG_732. Blocos em cinza representam cada cromossomo ou contig . Genes homólogos estão ligados por linhas coloridas. A manutenção e a inversão da ordem gênica estão representados em vermelho e em azul , respectivamente. O final do TcChr22 (700 kb) foi alinhado com a porção final de TcMARK_CONTIG_732. O fim da TcChr22 mostra semelhança com final de TcMARK_CONTIG_732 e ADWP02000472. A sequência da proteína P21 está marcada por uma seta.

5. Discussão

5.1. Análise da região genômica da P21 no genoma de isolados de *T. cruzi*

Alta similaridade nesse trabalho foi definida como sendo toda sequência gênica que apresenta alinhamento maior que 250bp comparada entre outras sequências, com similaridade maior que 70%. Foram encontradas oito sequências similares à sequência gênica da P21 no banco de dados do projeto genoma. O mais importante foi ver que a sequência gênica da P21 possui similaridade em apenas organismo que fazem parte do Taxon de *T. cruzi*. Confirmamos esses dados com análise em PCR.

É sugerido que *T. cruzi* e *T. rangeli* poderiam ter se originado a partir de uma linhagem de tripanossomas de morcego que posteriormente se adaptou aos mamíferos terrestres (LIMA et al., 2012; HAMILTON et al., 2012). Dentro deste contexto é interessante notar que a sequência da P21 não foi amplificada em *T. rangeli*. A amplificação ocorreu em todos os isolados de *T. cruzi*, salvo *T. cruzi marinkellei*. Estudos genômicos podem fornecer informações sobre adaptação evolutiva destes parasitas. A análise comparativa entre *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi* revelou que eles contem praticamente o mesmo repertório de genes (FRANZEN et al., 2012). *T. cruzi marinkellei* contém um gene adicional que parece ter sido resultante de transferência horizontal de material genético. O genoma desta espécie também exhibe variação no número de cópias e diversificação das famílias multigênicas, o que potencialmente pode resultar em um grande número de isoformas de proteínas relacionadas com a virulência do parasita (FRANZEN et al., 2012). Concluímos que a não amplificação do gene da P21 nesse organismo ocorreu por erro de anelamento da sequência iniciadora. Dentro deste contexto, tudo indica que a mesma sequência deveria ser amplificada em *T. cruzi marinkelli*. Confirmamos essa hipótese pelo alinhamento das sequências preditas de aminoácidos de todas as variantes da P21 consideradas com alta similaridade disponível no TritypDB. Esse alinhamento confirmou a similaridade existente nas sequências da P21. Observamos que a sequência de aminoácidos em *T. cruzi marinkellei* (TcMark_CONTIG_732) organiza-se de maneira contínua, sem um intervalo entre o 32º e 44º aminoácido da proteína, o que não ocorre na sequência de aminoácidos da proteína dos outros isolados. Além disso, as sequências encontradas no cromossomo

TcChr22-P do clone CL Brener e em *T. cruzi* Tula cl2 (número de acesso KB851845) existe uma extensão a mais contendo 25 aminoácidos.

Com relação ao clone CL Brener, este fato é esperado dado a origem híbrida deste isolado. A característica de um híbrido é a fusão dos núcleos de dois isolados diferentes. Na nova classificação de *T. cruzi* (ZINGALES et al., 2009) os híbridos foram incluídos nas linhagens Tc V (clone SO3-c15) e Tc VI (clone CL Brener). Por exemplo, o clone CL Brener tem alelos íntegros derivados da linhagem Tc II e de outra linhagem formadores de híbridos. Os híbridos apresentam cópias alélicas intactas cada uma delas derivada de uma linhagem. Não se sabe se os híbridos Tc V e Tc VI são produtos de único evento de hibridização seguido de divergência clonal, ou são resultantes de 2 eventos de hibridização independentes (DE FREITAS et al., 2006; WESTENBERGER et al., 2005). Dentro deste contexto ainda não há estudos que confirmem perfeitamente de quais organismos o clone CL Brenner surgiu. Assim, o estudo da similaridade nos ajudou a propor duas inferências: Primeiro, a P21 por não ter amplificado em *T. rangeli* e sua sequência estar presente em *T. cruzi marinkellei* sugere que essa proteína teria surgido durante e/ou após a especiação de *T. cruzi*, portanto, a sequência gênica dessa proteína poderia ser considerada como marcadora molecular do Taxon *T. cruzi*. Segundo, que a grande similaridade existente na sequência de aminoácidos encontrados no cromossomo TcChr22-P e em *T. cruzi* Tula cl2, sugere que o clone CL Brener, a parte não-Esmeraldo, pode ter vindo do grupo em que essa mesma cepa pertence e pode estar muito próximo a esse isolado filogeneticamente.

5.2. Análise da sintenia e rearranjos cromossômicos

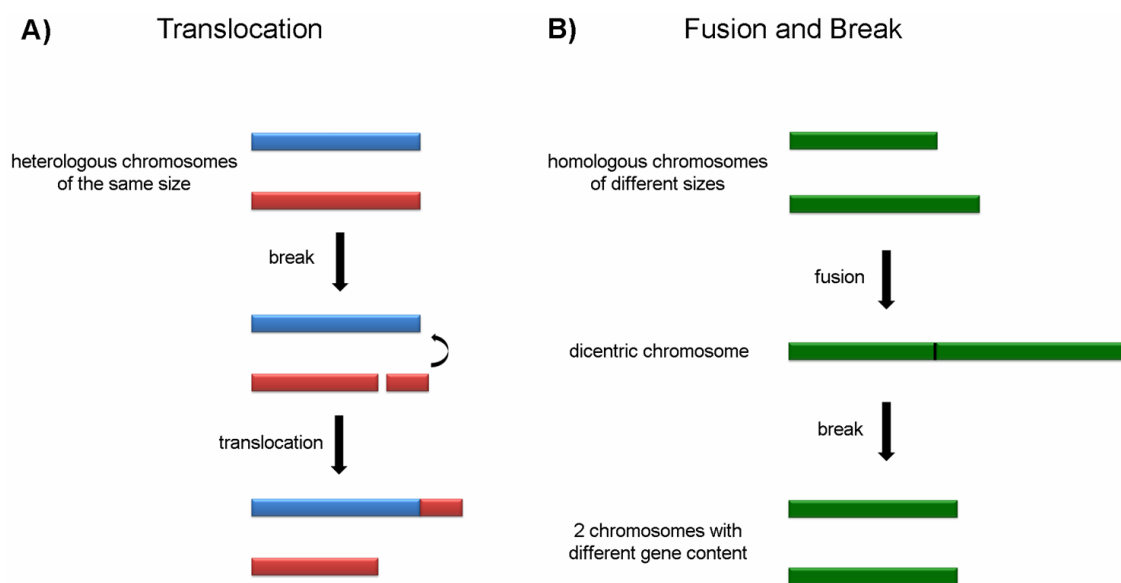
Foi necessária a determinação do cariótipo molecular da cepa 115 para que fosse feito a análise de sintenia do gene da P21 entre os isolados proposto nesse trabalho. Embora cariótipo molecular desse parasita pareça ser relativamente estável, foram encontrados polimorfismos cromossômicos em seu cariótipo quando comparado entre os isolados. Mesmo o gene de *T. cruzi* sendo plástico, (WESTENBERGER et. al, 2005; GAUNT et. al, 2003; EL-SAYED et. al, 2005; ARAYA et. al, 1997) a análise desse cariótipo mostrou que o tamanho e conteúdo genômico não sofreu muita alteração entre as cepas, sugerindo que o polimorfismo cromossômico não é devido ao conteúdo de

DNA , mas de uma organização genômica. A P21 está em um ambiente genômico heterogêneo e que possibilita o acontecimento de rearranjos cromossômicos. Quando hibridizado o DNA dos isolados de *T. cruzi* com os marcadores moleculares para o cromossomo 22 e a sonda P21 vimos a ocorrência de polimorfismo cromossômico. A diferença de tamanho cromossômico estimado entre os isolados foi relativamente pequena (cerca de 690 kb), sugerindo pequenos rearranjos cromossômicos. A sintenia no TcChr22 foi atribuída em apenas uma única banda cromossômica na cepa 115 (1.04 Mb) e em duas bandas de tamanhos semelhantes em CL Brener, CL, G e Y (cromossomos homólogos em tamanho polimórfico). A hibridização dos mesmos marcadores em duas bandas distintas leva-nos a especular que sequências repetitivas podem ter sido amplificadas ou que um fragmento cromossômico de aproximadamente 600 kb pode ter sido translocado em um dos homólogos , possivelmente por um mecanismo similar àquele sugerido na (Figura 15). Em contra partida a explicação para ter ocorrido apenas a hibridização de uma banca cromossômica na cepa 115 é de que os cromossomos homólogos de tamanhos diferentes existente em algum pariental fundiram para dar origem a um cromossomo dicêntrico e que esta foi seguida por quebra para gerar dois cromossomos de tamanho similar (cerca de 1,04 MB) (Figura 14). Os "novos" cromossomos pode ter parcialmente alterado o conteúdo gênico. (LIMA et. al, 2013).

Outra fonte de polimorfismo cromossômico reside na estrutura cromossômica terminal. Regiões telomérica e subteloméricas são hotspots para eventos de recombinação em vários microorganismos unicelulares (FREITAS-JUNIOR et. al, 200; PONZI et. al, 1990; LEPHART PR et. al, 2005; UPCROFT et. al, 2005) . Variação do comprimento dos telômeros foi descrito em diferentes cepas de *T. cruzi* . Cepa Y , Berenice e F possuem os telômeros que variam em tamanho de 0,5 a 1,5 kb , enquanto que os clones CL Brener e Dm28c têm telômeros significativamente maiores (de 1 a 10 kb) (FREITAS-JUNIOR et. al, 199).

Este fenômeno pode ser o resultado de muitas repetições do ciclo celular, que ocorrem na ausência de atividade da telomerase ou defeitos em componentes da cromatina telomérica, que, em mamíferos e leveduras pode culminar no encurtamento dos telômeros ou de fusão , com a formação de cromossomas dicêntricos (PALM et. al, 2008; FRIAS et al. 2012). A sequência da P21 está localizada próxima a uma região

telomérica, o que facilita a ocorrência de rearranjos cromossômicos nessa região. Os resultados observados no conteúdo genômico corroboram com essa sugestão. A análise feita nos cromossomos considerados homólogos do clone CL Brener, mostrou caráter heterogêneo desse cromossomo quando comparado entre seus homólogos (TcChr22 S-P). Enquanto um apresentou 16 seguimentos gênicos o outro apresentou 21. Esses seguimentos formam considerados importantes para esse cromossomo, já que apresenta proteínas que estão envolvidas com o seu sucesso evolutivo, como a própria P21. Um número de diferentes mecanismos pode ser responsável pelo polimorfismo do tamanho de cromossomo. É sabido que a proteína P21 é muito importante para o sucesso infectivo do parasita. No presente estudo, vimos que nos isolados do grupo Tc VI, Tc II e Tc I (CL Brener, CL, Y e G) a sua sequência se mantém sintênica, mas com uma região de rearranjos, porém quando observado a sua localização no isolado do grupo Tc V (Cepa 115), vimos que o cromossomo22 não somente teve redução de tamanho como também o seu tamanho modificado formando cromossomos iguais. Sabe-se hoje que as cepas G, CL e Y possuem maior infectividade em relação a outras cepas. Essas cepas já estão bem detalhadas na literatura e apresentam infectividade significativa no ciclo de vida doméstico. As cepas Y, G e CL, todas apresentaram a hibridização de duas bandas e, portanto a presença de cromossomos homólogos de tamanhos diferentes. O presente estudo analisou a localização gênica, o ambiente genômico e a ocorrências de rearranjos nos cromossomos em que a P21 está localizada e com essas informações ainda não conseguimos afirmar se essas variações e rearranjos podem estar relacionados com a infectividade de cada cepa, pois esse fator não é determinado por apenas um gene, mas um conjunto de genes dispostos em outros cromossomos que ainda precisam ser estudados. No entanto, os resultados apresentados nesse estudo favorecem que o cromossomo 22 possui um ambiente genômico importante para o parasita e que os rearranjos cromossômicos ocorridos em sua estrutura poderia levar a perda de alguns desses genes e consequentemente poderia modificar fatores infectivos desse parasita.



Lima et al., 2013.

Figura 14 - Possíveis mecanismos de recombinação gênica que poderiam dar origem a polimorfismo cromossômico em *T. cruzi*. Painel A) mecanismo de Translocação: um fragmento de DNA (210 kb) a partir de um cromossoma heterólogo (vermelho) é translocado para outro cromossoma (azul) através de recombinação homóloga, gerando cromossomos "homólogos" de tamanhos diferentes. Painel B) Um mecanismo fusão e ruptura: dois cromossomos homólogos de tamanhos diferentes são fundidos, formando um cromossomo dicêntrico que é então dividido, gerando dois cromossomos de tamanhos semelhantes, mas com conteúdo gene diferente .

6. Conclusão

O presente trabalho mostrou que mesmo ocorrendo reprodução clonal no *T. cruzi*, isso não impede que haja variações em seu genoma. Essas variações podem promover ganho ou perda de conteúdo genômico. Assim podemos concluir que:

1) A proteína P21 é exclusiva de *T. cruzi* e ela pode ser considerada espécie-específica e portanto poderia ser utilizada como marcador molecular para o taxon *T. cruzi*.

2) A P21 poderia auxiliar em estudos que busque explicação para a formação do clone CL Brener.

3) O ambiente gênomico da P21 denota um ambiente muito heterogenio, porém importante no percurso evolutivo do parasita, pois há a localização de genes de proteínas importantes para a vida do mesmo.

4) O cromossomo em que a sequência da P21 está localizada sofre rearranjos cromossômicos de acordo com as cepas estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, G., L. H. G. FREITAS-JUNIOR, W. COLLI, M. J. ALVES, AND S. SCHENKMAN. Expression of trans-sialidase and 85 kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J. Biol. Chem.* v.274,p.13041–13047, 1999.

ALVES, M. J. M.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 21, p. 75–82, 1986.

ALVES, M.J.; MORTARA, R.A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104 (Supl. 1), p.76-88, 2009.

ARAYA, J.E., CANO, M.I., YOSHIDA, N. AND FRANCE DA SILVEIRA, J. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.65, p.161-169, 1994.

AUGUSTINE, S. A. J.; KIESHCHENKO, Y. Y.; NDE, P. N.; PRATAP, S.; AGER, E.A.; BURNS-JR, J. M.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cell surface casein kinase II substrate, Tc1, involved in cellular infection. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 3922–3929, 2006.

BEACHEY, E.H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *Journal of Infectious Disease*, v. 143, p. 325-345, 1981.

BINGLE, L. E., EASTLAKE, J. L., BAILEY, M. & GIBSON, W. C. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology*. v.147, p.3231–3240, 2001.

BONTEMPI, E.J., PORCEL, B.M., HENRIKSSON, J., CARLSSON, L., RYDAKER, M., SEGURA, E.L., RUIZ, A.M. AND PETTERSSON, U. Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.66, p.147–151, 1994.

BORST P, RUDENKO G. Antigenic variation in African trypanosomes. *Science* v.264, p.1872–1873, 1994.

BRANCO MR, POMBO A: Chromosome organization: new facts, new models. *TRENDS CELL BIOL*, v.17, p.127-134, 2007.

BRANCO, M. R. E POMBO, A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biology*. v.4, p. 138, 2006.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v.27, p. 347-382, 1973.

BROST, P et al. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.6, p.13-23, 1982.

BU´ A, J., GARCIA, G.A., GALINDO, M., GALANTI, N. AND RUIZ, A.M. *Trypanosoma cruzi* genome: transcriptional mapping and karyotype correlation; molecular characterization of a surface antigen from the Tc13 family. *Medicina*. v.59, p.11–17, 1999.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 175 – 200, 1995.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 175 – 200, 1995.

CABRINE-SANTOS M, FERREIRA KA, TOSI LR, LAGES-SILVA E, RAMIREZ LE, PEDROSA AL. Karyotype variability in KP1(+) and KP1(–) strains of *Trypanosoma rangeli* isolated in Brazil and Colombia. *Acta Trop.* v.110, p. 57–64, 2009.

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; ANDREWS, N. W.; BURLEIGH, B. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal*, v. 17, p. 4975-4986, 1998.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. v.6, p. 93–100, 1964.

CHIURILLO MA, BECK AE, DEVOS T, MYLER PJ, STUART K, RAMIREZ JL. Cloning and characterization of *Leishmania donovani* telomeres. *Exp Parasitol* v.94, p.248–258, 2000.

CHIURILLO MA, CANO I, SILVEIRA JF, RAMIREZ JL. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the 466 protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. v.100, p.173–183, 1999.

CHIURILLO MA, PERALTA A, RAMÍREZ JL. Comparative study of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* telomeres. *Mol Biochem Parasitol*. v.120, p.305–308, 2002.

CHUENKOVA, M.V.; PEREIRA PERRIN, M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. *Sci Signal*, v. 2(97), p. 1-20, 2008.

CONTE FF, CANO MI Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Parasitol.* v.35, p.1435–1443, 2005.

D. ZINK, T. CREMER, R. SAÏRICH, R. FISHER, M. TRENDELENBURG, W. ANSORGE, E.H.K. STETZLER, Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum. Genet.* v.102, p, 241-251, 1998.

DE CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n. 4, p. 205-212, 1986.

De Carvalho, T.U.; De Souza, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n. 4, p. 205-212, 1986.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v.86, p.197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v.86, p.197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DVORAK, J.A et al. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analyse, I. Analyse of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* v.29, p.430-437, 1982.

ELIAS, M.C., FARIA, M., MORTARA, R.A., MOTTA, M.C., DE SOUZA, W., THIRY, M. AND SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryot. Cell.* v. 1, p.944–953, 2002.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BLANDIN G, BERRIMAN M, CRABTREE J, AGGARWAL G, CALER E, RENAULD H, WORTHEY EA, HERTZ-FOWLER C, GHEDIN E, PEACOCK C, BARTHOLOMEU DC, HAAS BJ, TRAN AN, WORTMAN JR, ALSMARK UC, ANGIUOLI S, ANUPAMA A, BADGER J, BRINGAUD F, CADAG E, CARLTON JM, CERQUEIRA GC, CREASY T, DELCHER AL, DIKENG A, EMBLEY TM, HAUSER C, IVENS AC, KUMMERFELD SK, PEREIRA-LEAL JB, NILSSON D, PETERSON J, SALZBERG SL, SHALLOM J, SILVA JC, SUNDARAM J, WESTENBERGER S, WHITE O, MELVILLE SE, DONELSON JE, ANDERSSON B, STUART KD, HALL N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. v.309, p.404–409, 2005.

ENGMAN, D.M., REDDY, L.V., DONELSON, J.E. AND KIRCHHOFF, L.V. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.22, p.115-123, 1987.

ERSFELD, K. AND GULL, K. Partitioning of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. *Science*. v.276, p.611–614, 1997.

FERNANDES, A. B.; NIEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitology Research*. v. 100, p. 59–68, 2006.

FERNANDES, A.B.; MORTARA, R.A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes and Infection*. v.6, n.5, p.460-467, 2004.

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; GERALDO YONEYAMA, K.A.; STRAUS, A.H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R.A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *International Journal for Parasitology*, v.37, n.13, p.1431-1441, 2007.

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.* v.27, p.2451–2456, 1999.

FU G, BARKER D Characterisation of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomereassociated sequence. *Nucleic Acids Res.* v.26, p.2161–2167, 1998.

GALANTI, N., J. A. DVORAK, J. GRENET, AND J. P. MCDANIEL. Hydroxyurea induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Exp. Cell Res.* v. 214, p. 225–230. 1994.

GARCIA, G.A., JOENSEN, L.G., BU' A, J., ANCIART, N., PERRY, S.J. AND RUIZ, A.M. *Trypanosoma cruzi*: molecular identification and characterization of new members of the Tc13 family. Description of the interaction between the Tc13 antigen from Tulahuen strain and the second extracellular loop of the b-1 adrenergic receptor. *Exp. Parasitol.* v.103, p. 112–119, 2003.

GIBSON, W. C. & STEVENS, J. R. Genetic exchange in the trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* v. 43, p.1–46, 1999.

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

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Na acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 65, p. 85–94, 1994.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W.; MANNING, J. E.; ALVES, M. J. M. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 3461–3468, 1999.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M. D.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R. L.; SCHREVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc 80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 47078–47086, 2001.

H. BORNÆTH, P. EDELMANN, D. ZINK, T. CREMER, C. CREMER. Quantitative motion analysis of sub-chromosomal foci in vivo in four-dimensional microscopic images. *Biophys. J.* v.77, p. 2871-2886, 1999.

HENRIKSSON, J., ASLUND, L., MACINA, R.A., FRANKE DE CAZZULO, B.M., CAZZULO, J.J., FRASCH, A.C. AND PETTERSSON, U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. 1990.

HENRIKSSON, J., PORCEL, B., RYDAKER, M., RUIZ, A., SABAJ, V., GALANTI, N., CAZZULO, J.J., FRASCH, A.C. AND PETTERSSON, U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.73, p.63–74, 1995.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R.G. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, n.283842, p.1-10, 2010.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*, v. 88, p. 283-294, 1984.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*, v. 88, p. 283-294, 1984.

JACKSON, D. Understanding nuclear organization when information become knowledge. Workshop of nuclear organization. *Embo Reports*. v.6, p.213-217, 2005.

KNIGHT, J. All genomes great and small. *Nature*. v.417, p. 374–376, 2002.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v.168, n.2, p.649-659, 1988.

LIRA CB, GIARDINI MA, NETO JL, CONTE FF, CANO MI .Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol.* v.23, p.357–362, 2007.

MACHADO, C. A. & AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. v. 98, p.7396–7401, 2001.

MARQUEZ DS, RAMIREZ LE, MORENO J, PEDROSA AL, LAGES-SILVA E *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Exp Parasitol.* v.117, p. 35–42, 2007.

MATSUDA, N.M.; MILLER, S.M.; ÉVORA, P.R.B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Clinics*, v. 64(12), p. 1219-1224, 2009.

MCDANIEL, J.P AND DVORAK, J.A. Identification, Isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.57, p.213-222, 1993.

MORTARA, R. A. Trypanosoma cruzi: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on surface of HeLa cells. *Experimental Parasitology*, v. 73, n. 1, p. 1-14, 1991.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C.; SILVA, C. V.; FERNANDES, A. B.; L'ABBATE, C.; da SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to Trypanosoma cruzi: trypomastigote versus amastigote entry Sub-cellular. *Biochemistry*, v. 47, p. 101-109, 2008.

MOTT, A.; LENORMAND, G.; COSTALES, J.; FREDBERG, J.J.; BURLEIGH, B.A. Modulation of host cell mechanics by Trypanosoma cruzi. *J Cell Physiol*, v. 218(2), p. 315-322, 2009.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. *Journal of Experimental Medicine*, v. 142, p. 224-229, 1975.

OHNO, S. *Evolution by Gene Duplication* (Springer, Berlin, 1970).

PAN, S.C. Trypanosoma cruzi: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. *Experimental Parasitology*, v.45, n.2, p.274-286, 1978.

RAMIREZ, M.I.; RUIZ, R.C.; ARAYA, J.E.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecules of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 3636-3641, 1993.

RASSI, A.; RASSI Jr, A. Doença de Chagas. In: AMATO NETO, V.; GRYSCHKE, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 127-138, 2008.

RÊGO, S.F.M. Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) no sangue circulante de camundongo branco (*Mus musculus*). *Folia Clinica et Biologica*, v.26, p.17-45, 1956.

RUIZ, R.C.; FAVORETO, S.JR.; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* isolates is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signaling activity. *Biochemical Journal*, v. 330, p. 505-511, 1998.

SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.1989

SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. R. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochemical Journal*, v. 325, p. 129–137, 1997.

SCHARFSTEIN, J., MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas Disease. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v.94, p.51-63, 1999.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A.P.C.A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *Journal Experimental Medicine*, v. 192, p. 1289-1299, 2000.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 583-588, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 33, n. 5, p. 3516, 1991.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIONVANNA, B.; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRON, T. C. B. S.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R. S.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection*, v. 11, p. 563-570, 2009.

SMULSKI, C.R.; LONGHI, S.A.; AYUB, M.J.; EDREIRA, M.M.; SIMONETTI, L.; GÓMEZ, K.A.; BASILE, J.N.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; LEVIN, M.J. Interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex (stalk) and the elongation factor 2. *Molecular Recognition*, v. 24, p. 359-370, 2010.

SOLARI, A.J. The 3-dimensional fine structure of mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma*, v.78, p.39–255, 1980.

SPADILIERO, B., NICOLINI, C., MASCETTI, G., HENRIQUEZ, D. AND VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. *J. Cell. Biochem.* v.85, p.798–808, 2002.

SPADILIERO, B., SANCHEZ, F., SLEZYNGER, T.C. AND HENRIQUEZ, D.A. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Biochem.* v.84, p.832–839, 2002.

THOMPSON, C.T AND DVORAK, J.A. Quantification of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. *Anal. Biochem.* v.177, p.353-357, 1989.

TIBAYRENC, M., KJELLBERG, F. AND AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, p.2414–2418, 1990.

TODOROV, A. G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MULLER-ESTERI, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R. C.; NETO, H. C.; SCHARFSTEIN, J. Trypanosoma cruzi induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. FASEB Journal, v. 17, p. 73 – 75, 2003.

TODOROV, A.G.; EINICKER-LAMAS, M.; CASTRO, S.L.; OLIVEIRA, M.M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by Trypanosoma cruzi infection. The Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 32182-32186, 2000.

VALLEJO GA, GUHL F, CARRANZA JC, LOZANO LE, SÁNCHEZ JL, JARAMILLO JC, GUALTERO D, CASTAÑEDA N, SILVA JC, STEINDEL M. kDNA markers define two major Trypanosoma rangeli lineages in Latin-America. Acta Trop v.81, p.77–82, 2002.

VANHAMME L, PAYS E, MCCULLOCH R, BARRY JD . An update on antigenic variation in African trypanosomes. Trends Parasitol.v.17, p.338–343, 2001.

VILLALTA, F.; SMITH, C.; RUIZ-RUANO, R.; LIMA, M. F. A ligand that Trypanosoma cruzi uses to bind to mammalian cells to initiate infection. FEBS Letters, v. 505, p. 383–388, 2001.

WAGNER, W. AND SO, M. Genomic variation of Trypanosoma cruzi: Involvement of multicopy genes. Inf. Imm.v.58, p.3217-3224,1990.

WINCKER P, RAVEL C, BLAINEAU C, PAGES M, JAUFFRET Y, DEDET JP, BASTIEN P. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Res. v.24, p.1688–1694, 1996.