



**ESTUDO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DO
GENE DO RNA RIBOSSOMAL (rRNA) EM CEPAS DE
Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 ISOLADAS DE
DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS**

Florianópolis, fevereiro de 2003

Ingrid Thaís Beltrame Botelho

ESTUDO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DO
GENE DO RNA RIBOSSOMAL (rRNA) EM CEPAS DE
Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 ISOLADAS DE
DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia, Universidade Federal de
Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos
Grisard**

FLORIANÓPOLIS

2003

BELTRAME-BOTELHO, Ingrid Thaís

ESTUDO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL (rRNA) EM CEPAS DE *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 ISOLADAS DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS / Ingrid Thaís Beltrame Botelho. Florianópolis, 2003. 89p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina

1. *Trypanosoma rangeli*. 2. Variabilidade intra e interespecífica. 3. Gene do RNA ribossomal. 4. ITS (internal transcribed spacer)

Dedico este trabalho primeiramente a meus pais, Vitório (*in memoriam*) e Loiva, pela oportunidade, apoio e carinho constantes; ao amor da minha vida, Maurício, que sempre me incentivou e não me deixou desistir e a meu filho, que ainda está dentro de mim, mas que já me dá a certeza de um FUTURO maravilhoso.

“Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um
milagre.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard pela confiança, paciência e ensinamentos da real importância do dia-a-dia em laboratório. Ed, você foi e é muito mais que um orientador, obrigada, amigo!

Ao Prof. Mário Steindel pela acolhida, pelo ensinamento e inestimável força no decorrer de minha formação.

À minha grande amiga, Cristiane Quimelli que me abriu as portas do Laboratório e me deu as primeiras e imprescindíveis dicas do dia-adia no Lab., obrigada, Cris por sua amizade, por sua alegria!

Ao amigo Juliano, por todo tempo que reservou a mim e por ter tido a paciência de me ensinar tudo que sabia sobre sequenciamento. Você é demais!

A minha inesquecível Ane, que esteve sempre pronta a me colocar pra cima quando pensava que estava tudo desmoronando. Você, amiga, é mais do que Especial!

Aos amigos Rúbia e Rodrigo, pelo apoio constante, pela confiança e agradáveis horas de convívio.

A Bibiana pela ajuda e incentivo em busca da placa perfeita.

Á Daniela, minha primeira pupila, pela paciência em me aturar e pela ajuda imprescindível. Sucesso!

Á todos os amigos do Proto Priscilla, Mônica, Letícia, Léo, Narjara, Janaína, Milene, Débora, Luíza e Juliana, pela alegria e jogos da verdade que tanto nos divertiram. Vocês são MARAVILHOSOS!

Ao Prof. Dr. Alberto M. R. Dávila pela acolhida no Rio de Janeiro e auxílio na análise dos dados do seqüenciamento utilizando a bioinformática.

Aos amigos de turma Roni, Carol, Renata, Priscila, Gabriela e Koga pelo apoio e convivência.

À coordenação do Programa de Mestrado em Biotecnologia e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia pela colaboração.

À CAPES, pela fornecimento da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Parasitas	17
3.2. Extração de DNA	18
3.3. Dosagem do DNA	19
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
3.5. Purificação e clonagem dos produtos de PCR	23
3.6. Seqüenciamento do DNA	23
3.7. Análise das seqüências obtidas	24
4. Resultados	26
5. Discussão	50
6. Conclusões	62
7. Referências Bibliográficas	65
8. Anexos	89

LISTA DE TABELAS

TABELA I: Cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e hospedeiro analisadas no presente trabalho.

TABELA II: Formulação dos 12 tampões utilizados na otimização das reações de PCR para amplificação da região correspondente aos espaçadores ITS-1 e ITS-2 e a subunidade 5,8S do gene do rRNA.

TABELA III: Relação dos polimorfismos de monocleotídeos (SNP's) e dos eventos de inserção e deleção detectados pela avaliação comparativa das seqüências das regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Forma tripomastigota do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado. Corado pelo método de Giemsa, aumento de 1000x.

FIGURA 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992, segundo a OMS e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres.

FIGURA 3: Representação esquemática do gene do rRNA demonstrando as porções 18S, 5,8S e 28S do gene, as regiões espaçadoras ITS -1 e ITS- 2 e a região NTS.

FIGURA 4: Representação esquemática do gene do rRNA, assinalando as sub-unidades 18S, 5,8S e 28S, as regiões espaçadoras transcritas (ITS) e os sítios de ligação dos iniciadores utilizados na amplificação e/ou seqüenciamento da unidade de repetição completa do gene.

FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de *Trypanosoma rangeli* utilizando o protocolo dos 12 tampões.

FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de *Trypanosoma rangeli* de diferentes regiões geográficas utilizando os tampões 5 e 9.

FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio representando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas utilizando um gradiente de temperatura (45°C a 70°C).

FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas após procedimento de purificação.

FIGURA 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio representando os produtos da digestão do DNA do plasmídeo pCR[®]4-TOPO[®] pela enzima *EcoRI*, revelando a presença de insertos correspondentes a região ITS de diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli*.

FIGURA 10: Alinhamento das seqüências da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e hospedeiros pelo software ClustalX.

FIGURA 11: Filograma consenso resultante da análise das seqüências espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e hospedeiros por máxima parsimônia (200 bootstraps).

FIGURA 12: Filograma consenso resultante da análise das seqüências espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* , *T. cruzi* e *Leishmania* spp. por máxima parsimônia (200 bootstraps).

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR ou **RAPD** - do inglês *Arbitrary primed polymerase chain reaction* ou *Random amplified polymorphic DNA*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Deoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

g – Grama

ITS – do inglês *Internal Transcribed Sequences* ou *Spacers*

kb - Kilobases

kDNA - Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplasto

LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*

LSSP-PCR – do inglês *Low stringency single specific primer - Polymerase Chain Reaction*

M – Molar

MIP – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

μg – Micrograma

ml – Mililitro

μl – microlitro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

NTS – do inglês *Non Transcribed Spacers*

°C – Graus centígrados

pb – Pares de bases

PBS – do inglês *Phosphate Buffer Saline*

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico ou concentração de íons H^+

RAPD – do inglês *Random amplified polymorphic DNA*

RFLP – do inglês *Restriction-Fragment Length Polymorphisms*

RNA – Ácido ribonucléico

rRNA - RNA ribossomal

RNAse - Ribonuclease

SBF – Soro bovino fetal

SSU rRNA – RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo

LSU rRNA – Subunidade maior do RNA ribossomal

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris-Borato/ EDTA

TE – Tampão Tris/ EDTA

Tris – Tris (hidrometil) amino metano

UV – Ultravioleta

V - Volt

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli*, assim como o *T. cruzi*, são protozoários hemoflagelados, parasitas de uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo humanos, numa ampla extensão da América do Sul e Central. Apesar da aparente apatogenicidade para mamíferos, o *T. rangeli* determina reações sorológicas cruzadas com *T. cruzi*, dificultando desta forma o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Uma grande heterogeneidade intra-populacional destes parasitas foi comprovada pelas marcantes diferenças no comportamento biológico tanto em hospedeiros vertebrado como invertebrados e, mais recentemente, por vários marcadores moleculares. Nesse sentido, o presente estudo avaliou comparativamente os espaçadores ITS-1 e ITS-2 que flanqueiam a subunidade 5,8S do gene do RNA ribossomal (rRNA) entre diferentes cepas de *T. rangeli* isoladas de hospedeiros e origens geográficas distintas. Tendo revelado um baixo nível de variabilidade de ambos os espaçadores entre as cepas estudadas, os resultados revelaram a existência de polimorfismos de mononucleotídeos (SNP's) na subunidade 5,8S do gene do rRNA. Apesar da observação que o espaçador ITS-1 demonstrou-se menos polimórfico que o ITS-2, não foi possível realizar nenhuma inferência epidemiológica. A inclusão de seqüências homólogas do gene do rRNA de cepas de *T. cruzi* e *Leishmania* sp. demonstrou a possível utilização deste marcador na diferenciação interespecífica de tripanosomatídeos.

ABSTRACT

Like *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* is a hemoflagellate protozoan parasite of a variety of mammalian hosts, including humans, in a wide geographical area in both Central and South America. Despite the apparently non-pathogenic nature of *T. rangeli*, this parasite infection allows the occurrence of serological cross-reactivity with *T. cruzi*, turning difficult the specific diagnosis of Chagas disease. Studies on biological aspects of these parasites, such as evolution and behavior in mammalian hosts and triatomine vectors, revealed important intra and inter-specific heterogeneity, which was reinforced by analysis of several molecular markers. In this study, we have comparatively evaluated the ITS-1 and ITS-2 spacer flanking the 5.8S subunit of the ribosomal RNA gene (rRNA) among *T. rangeli* strains isolated from distinct hosts and geographical origins. Revealing a low-level variability of both spacers, our results also showed the existence of single nucleotide polymorphisms (SNP's) within the 5.8S subunit of the rRNA gene. Even revealing that ITS-1 spacer was less polymorphic than ITS-2, no epidemiological inferences were possible. Inclusion of homologous sequences of the rRNA gene from *T. cruzi* and *Leishmania* sp. strains showed that ITS regions are feasible markers for inter-specific differentiation of trypanosomatids.

1 - INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 assim como o *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, são protozoários flagelados pertencentes ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae (Figura 1). Estes parasitas, assim como outros representantes da Ordem Kinetoplastida tem como principais características a presença da organela chamada cinetoplasto localizada na base do flagelo que contém o DNA mitocondrial também chamado de kDNA (VICKERMAN, 1976), a compartimentalização da glicólise dentro de um microcorpo chamado “glicosoma” (MICHELS & HANNAERT, 1994) e o processo de trans-splicing, pelo qual uma seqüência curta e conservada de RNA chamada “spliced leader” ou “mini-exon” é adicionada pós-transcricionalmente a todos os RNA mensageiros (SUTTON & BOOTHROYD, 1986; MURPHY *et al.*, 1986).

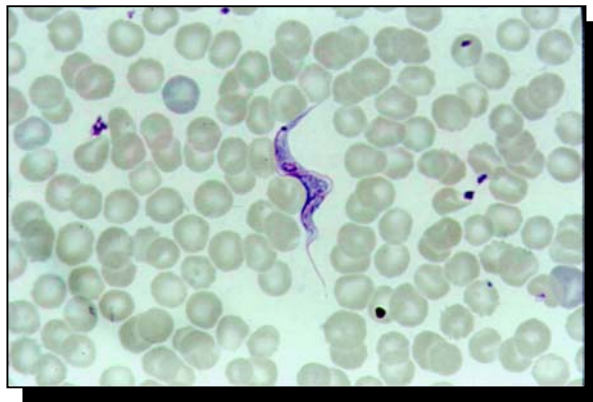


FIGURA 1: Forma tripomastigota do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado. Corado pelo método de Giemsa, aumento de 1000x.

Baseado no modo de transmissão, HOARE (1972) e LOSOS (1986) dividiram o gênero *Trypanosoma* nas seções Salivaria e Stercoraria, que diferem, entre outras características na maneira como são transmitidos os parasitas aos hospedeiros vertebrados.

Parasitas incluídos na seção Salivaria são transmitidos através da picada (via inoculativa), enquanto os representantes da seção Stercoraria são transmitidos por meio das fezes dos insetos vetores (via contaminativa). Taxonomicamente, o *T. rangeli* foi incluído por HOARE (1972) no subgênero *Herpetosoma* dentro da seção Stercoraria, grupo este que também alberga o *T. cruzi*, sendo considerado um elo filogenético entre os parasitas incluídos em ambas as seções (D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1992).

Segundo De LEON (1952), a distribuição geográfica deste tripanossoma parece ser tão extensa quanto a do *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, estando a sua transmissão igualmente associada a condições precárias de moradia e, conseqüente facilidade na domiciliação de triatomíneos (Figura 2). Corroborando estas observações, o *T. rangeli* já foi encontrado infectando as fezes de ninfas e de adultos de *Panstrongylus megistus* e, experimentalmente pode ser transmitido por *Triatoma dimidiata*, *T. patagonica*, *T. protracta*, *T. vitticeps* e *T. infestans* (D'ALESSANDRO, 1976; TOVAR, URDANETA-MORALES & TEJERO, 1989). Entretanto, espécies silvestres de triatomíneos com hábitos hematófagos diurnos do gênero *Rhodnius* são considerados os principais vetores naturais ou experimentais do *T. rangeli*, destacando-se o *R. prolixus* e o *R. brethesi* (STEINDEL *et al.*, 1991; D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; COURA *et al.*, 1996).

Estudos recentes demonstram que determinadas cepas de *T. rangeli* tendem a infectar apenas algumas espécies do gênero *Rhodnius*, o que reforça a existência de uma complexa relação parasita-vetor comprovada pela suscetibilidade distinta de diferentes espécies de triatomíneos a cepas do parasita isoladas de diferentes regiões geográficas (MACHADO *et al.*, 2001).

De acordo com GRISARD (1999), ao contrário de seu ciclo no hospedeiro vertebrado, o curso da infecção pelo *T. rangeli* no inseto vetor é bem conhecido e descrito

na literatura. Nestes hospedeiros *T. rangeli* possui ação patogênica devido a intensa proliferação, tanto de forma livre na hemolinfa, como no interior dos hemócitos dos insetos ocasionando a intensa destruição destas células (TOBIE, 1964; CUBA CUBA *et al.*, 1972; D'ALESSANDRO, 1976; HECKER, SCHWARZENBACH & RUDIN, 1990; GRISARD, 1999).

A infecção do hospedeiro vertebrado é realizada primariamente através da picada do inseto vetor e caracterizada por um curto período pré-patente (1 a 4 dias). No período de 15 a 20 dias pós-infecção um discreto número de parasitas pode ser detectado no sangue circulante por exame a fresco. Entretanto, após este período e até cerca de 18-24 meses, a infecção só pode ser diagnosticada através de métodos indiretos como a hemocultura e o xenodiagnóstico (SOUSA & JOHNSON, 1971; STEINDEL, 1993). O decréscimo no número de parasitas circulantes em animais infectados pelo *T. rangeli* tem ocorrido de maneira análoga ao que acontece com o *T. cruzi* em humanos, ou seja, é devida a ação da resposta imune humoral promovida pelo organismo hospedeiro (BRENER, 1977).

Distintamente, o *T. cruzi* é transmitido ao hospedeiro vertebrado somente através das fezes do triatomíneo infectado. Após cerca de 30 a 90 dias da infecção ocorre a chamada fase aguda da doença onde sintomas brandos como febre baixa e duradoura são usualmente aliadas a presença de sinais na porta de entrada do parasita (chagomas). Neste período, formas tripomastigotas sangüíneas podem eventualmente ser detectadas através de exames de sangue a fresco ou em esfregaços corados pelo método de Giemsa. A próxima fase, denominada fase crônica, é caracterizada por uma infecção sub-clínica e os parasitas só são detectados via métodos indiretos. Esta fase pode variar de um quadro assintomático ou indeterminado até formas graves da doença com comprometimento cardíaco e/ou digestivos (BRENER, 1994; DIAS, 2000). Esta considerável diversidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas tem sido atribuída à comprovada

heterogeneidade genômica e/ou proteômica do parasita e a variabilidade da resposta imune do hospedeiro (DIAS, 2000).

Além da transmissão vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido ainda através de transfusão sangüínea, por via oral ou por via congênita, sendo estas de menor importância epidemiológica quando comparadas à transmissão vetorial (BITTENCOURT, 2000; DIAS, 2000).

T. rangeli e *T. cruzi* têm sido encontrados infectando humanos assim como uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres numa ampla extensão da América do Sul e Central (DE LEON, 1949; 1952; HOARE, 1972; D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; CUBA CUBA, 1998; SOUTO, VARGAS & ZINGALES, 1999) (Figura 2). A presença do *T. rangeli* na América Central e no norte da América do Sul em países como Colômbia, Venezuela e Peru foi claramente estabelecida, assim como na bacia Amazônica Brasileira, no sul do Brasil e numa região endêmica para a doença de Chagas no sudeste brasileiro (DEANE, 1958; MILES *et al.*, 1983; STEINDEL, *et al.*, 1991; DIOTAIUTI *et al.*, 1992; SULLIVAN *et al.*, 1993; RAMIREZ *et al.*, 1998).



FIGURA 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992, segundo a OMS (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (◆) (Segundo GRISARD *et al.*, 1999).

Além de ser encontrado em seus hospedeiros invertebrados, o *T. rangeli* tem sido encontrado em cerca de 20 gêneros pertencendo a 5 diferentes ordens de mamíferos (D'ALESSANDRO & SARAIVIA, 1999; GRISARD *et al.*, 1999). No Brasil é encontrado, principalmente, em gambás e roedores, não demonstrando, como constatado para outras espécies do subgênero *Herpetosoma*, especificidade de hospedeiro (D'ALESSANDRO & SARAIVIA, 1992).

A infecção humana por *T. rangeli* já foi constatada em 7 países sul-americanos perfazendo cerca de 2700 casos comprovados (D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO & SARAIVIA, 1992; 1999). No Brasil o primeiro caso humano foi descrito por COURA *et al.* (1996) no Estado do Pará e os registros definitivos da ocorrência do parasita foram publicados por STEINDEL *et al.* (1991, 1992); DIOTAIUTI *et al.* (1992) e por COURA *et al.* (1996).

Embora seja encontrado infectando humanos, o *T. rangeli* é aparentemente não patogênico para os mesmos (HOARE, 1972), entretanto induz neles uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos. Por apresentar comprovadamente cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel homóloga a de *T. cruzi* (AFCHAIN *et al.*, 1979), com quem compartilha vetores triatomíneos e hospedeiros vertebrados determinando infecções mistas (VARGAS *et al.*, 2000), é comum a ocorrência de reações sorológicas cruzadas com o agente etiológico da Tripanossomíase Americana, dificultando desta forma o diagnóstico sorológico desta doença, principalmente em sua fase crônica (GUHL *et al.*, 1987; HUDSON *et al.*, 1988; ROSS & NOVOA-MONTERO, 1993; SALDAÑA, SOUSA & ÖRN, 1995; SALDAÑA & SOUSA, 1996; 1996b; VARGAS *et al.*, 2000)

Assim sendo, a falta de procedimentos adequados para o diagnóstico específico e a ausência de manifestações clínicas tem levado a uma subestimação do número de casos de

humanos infectados pelo *T. rangeli* e, conseqüentemente, a uma possível superestimação no número de casos de infecções humanas pelo *T. cruzi* (VARGAS *et al.*, 2000).

A detecção da infecção pelo *T. rangeli* em vertebrados é realizada de modo similar ao diagnóstico da doença de Chagas, ou seja, por métodos parasitológicos como esfregaços sangüíneos, hemocultura e xenodiagnóstico e por métodos sorológicos como imunofluorescência, ELISA e Western blot (SALDAÑA *et al.*, 1995; GRISARD, 1999).

No hospedeiro invertebrado a detecção do *T. rangeli* tradicionalmente é realizada baseada em seu ciclo de vida, sendo assim, o exame da hemolinfa é o mais utilizado (D'ALESSANDRO, 1976). O exame das fezes dos insetos vetores é também realizado, porém a identificação específica de *T. rangeli* ou *T. cruzi* torna-se difícil e, com certeza, pode levar a inferências epidemiológicas errôneas (GRISARD, 1999).

A inspeção microscópica direta destes parasitas, ainda que sugestiva, não é conclusiva, pois ambos possuem os vários estágios de desenvolvimento morfológicamente indistinguíveis (GRISARD, 1999). O Xenodiagnóstico tem sido proposto para distinguí-los, pois o *T. rangeli* possui a capacidade de penetrar e desenvolver-se nas glândulas salivares e hemolinfa de triatomíneos, sendo principalmente transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada dos insetos infectados. Ao contrário, *T. cruzi* é encontrado somente no trato digestivo dos mesmos, sendo transmitido a seu hospedeiro vertebrado através das fezes do inseto vetor (HOARE, 1972). Apesar destas características, o hospedeiro invertebrado pode apresentar o *T. rangeli* também nas fezes, embora estas formas tenham infectividade duvidosa.

Com base nas afirmações acima sobre a sensibilidade variável e decrescente no xenodiagnóstico, SOUTO *et al.* (1999) consideram tal exame não recomendado para o diagnóstico específico do agente causador da doença de Chagas. Sendo assim,

procedimentos alternativos têm sido propostos tais como a avaliação da susceptibilidade a lise mediada pelo complemento, reação com anticorpos monoclonais, aglutinação por lectinas (ACOSTA *et al.*, 1991; STEINDEL *et al.*, 1991), detecção da secreção de neuraminidase no meio de cultura (SCOTTELIUS, 1987), perfil de restrição do DNA cinetoplástico (GONÇALVES *et al.*, 1991; VALLEJO *et al.*, 1994) isoenzimas, análises de perfis de RAPD, suscetibilidade de triatomíneos e análises do gene do mini-exon (MACEDO *et al.*, 1993; STEINDEL, 1993; STEINDEL *et al.*, 1994; GRISARD, 1999; GRISARD *et al.*, 1999a).

Estas técnicas requerem uma propagação prévia do parasita em meio axênico, um procedimento que, segundo SOUTO *et al.* (1999) pode induzir a seleção de uma população particular de tripanossomas o que levaria a resultados por vezes não confiáveis. Este fato baseia-se na forma reprodutiva observada nos parasitas da Ordem Kinetoplastida que permite uma expansão clonal.

Sabidamente, qualquer espécie de microorganismo exhibe, na maioria das vezes, uma considerável diversidade genética que pode ter um profundo impacto na diversidade biológica geral dos organismos considerados, incluindo propriedades relevantes medicinalmente, tais como a patogenicidade ou a resistência a drogas (TIBAYRENC, 1998).

As várias técnicas bioquímicas e moleculares usadas na tipagem e subtipagem de patógenos são geralmente referidas como pertencentes a epidemiologia molecular, que enfatiza a relevância dos conceitos e métodos de genética evolucionária no estudo da epidemiologia de protozoários parasitas e outros agentes patogênicos.

A variação genética em protozoários parasitas de relevância médica e a natureza das estratégias reprodutivas que predispõe tal variação são objetos de muito interesse e

controvérsia (DYE *et al.*, 1990; TIBAYRENC *et al.*, 1990; 1991; TIBAYRENC & AYALA, 1991; HURST *et al.*, 1992; SIBLEY & BOOTHROYD, 1992). Esta heterogeneidade genética leva a ocorrência de diferentes fenótipos que podem ser associados com uma diversidade de manifestações clínicas importantes (CUPOLILLO *et al.*, 1998).

Pesquisas comparativas realizadas com o *T. rangeli* e com o *T. cruzi* demonstraram uma grande heterogeneidade populacional comprovada pelas marcantes diferenças no comportamento biológico das diversas cepas estudadas tanto em hospedeiros vertebrados como invertebrados e, mais recentemente, por vários marcadores genéticos como a eletroforese enzimática de multilocus (MLEE) e o uso de sondas de DNA, que reforçaram a existência de uma considerável variabilidade genética intra e interespecífica em ambas as espécies de parasitas (BRENIÉRE *et al.*, 1993; ANDREWS & CHILTON, 1999; BRENER & CHIARI, 1963; STEINDEL *et al.*, 1994; BOGLIOLO, LAURIA-PIRES & GIBSON, 1996; MACEDO & PENA, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999; GRISARD *et al.*, 1999).

Em *T. cruzi* esta heterogeneidade genotípica e fenotípica é vista como resultante de seu processo clonal de propagação, no qual propõe-se que há um acúmulo de mutações nas diferentes subpopulações do parasita (TIBAYRENC *et al.*, 1990). DVORAK *et al.* (1980), demonstraram que as cepas de *T. cruzi* apresentam notáveis diferenças na quantidade total de DNA/parasita, sugerindo que sua heterogeneidade biológica poderia ser resultante de diferenças genéticas. Segundo BRENER (1992), o *T. cruzi* é constituído por populações heterogêneas de parasitas, compostas por diferentes clones que circulam entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. Por conseguinte, um grande desafio é identificar marcadores moleculares de cepas de *T. cruzi* que possam ser correlacionadas com a sua larga margem de comportamento experimental e com a enigmática distribuição das manifestações clínicas da doença de Chagas.

Parâmetros biológicos, bioquímicos e moleculares têm também demonstrado um significativo polimorfismo entre as cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes vetores triatomíneos e hospedeiros vertebrados de regiões geográficas distintas (D'ALESSANDRO, 1976; MACEDO *et al.*, 1993b; GRISARD *et al.*, 1999; VALLEJO *et al.*, 2001)

A recente adoção de tecnologias de análise de DNA e/ou RNA na detecção e caracterização de parasitas tem apresentado resultados bastante promissores (GULL, 2001). As técnicas apresentam-se reprodutíveis, muito sensíveis e com alta especificidade, estando as seqüências alvo no DNA nuclear, cinetoplástico ou ribossomal conservadas durante as distintas fases do ciclo desses protozoários (GRISARD, 1999). Inúmeros métodos da biologia molecular tem sido usados na detecção, caracterização e diferenciação específica entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi* como as sondas de DNA total (GREIG & ASHALL, 1987), sondas de DNA nuclear, sondas de kDNA (GONZALEZ *et al.*, 1984; SANCHEZ *et al.*, 1984; MACINA *et al.*, 1987; REQUENA *et al.*, 1992; VALLEJO *et al.*, 1994) e sondas de RNA ribossomal (BENAVIDES *et al.*, 1993).

A amplificação via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) de seqüências repetitivas do DNA é outra técnica que está sendo bastante utilizada na detecção e caracterização de parasitas (MASIGA *et al.*, 1992, 1996; McNAMARA *et al.*, 1995; SOLANO *et al.*, 1995; McLAUGHLIN *et al.*, 1996; MASAKE *et al.*, 1997; MORLAIS *et al.*, 1998; VALLEJO *et al.*, 2001; DESQUESNES *et al.* 2001). O PCR permite a geração exponencial de cópias de seqüências específicas a partir de um DNA molde de dupla fita. A síntese enzimática ocorre “*in vitro*” e utiliza, além de iniciadores específicos, deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) e a *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável. Com a alternância de ciclos de temperatura, o DNA é desnaturado, os iniciadores ligam-se a fita molde

(annealing) e então inicia-se a síntese ou extensão da seqüência a ser amplificada (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS & FALOONA, 1987).

A técnica da PCR possui variantes que permitem caracterizar molecularmente isolados de diferentes espécies de parasitas como ao utilizar-se iniciadores aleatórios (AP-PCR ou RAPD), a amplificação em condições de baixa estringência utilizando-se somente um iniciador específico (LSSP-PCR) ou ainda a amplificação específica seguida da clonagem e seqüenciamento de diferentes genes (STEINDEL *et al.*, 1993; BELKUN, 1995; BARRETO *et al.*, 1996; VAGO, 1996; STEVENS *et al.*, 1999; GRISARD *et al.*, 1999; GRISARD, 1999; BRISSE, DUJARDIN & TIBAYRENC, 2000).

Atualmente vários genes foram descritos e têm sido alvos da amplificação via PCR com o intuito de diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, entre eles destacam-se: gene do mini-exon ou spliced-leader (MURTHY, DIBBERN & CAMPBELL, 1992; RAMOS *et al.*, 1996; GRISARD, 1999), genes que codificam a proteína flagelar (SILBER *et al.* 1997), o DNA cinetoplástico (kDNA) (VALLEJO *et al.*, 1999; 2002), o gene da cisteína proteinase (TANAKA, 1997), além dos genes do RNA ribossomal (rRNA) que permitem o diagnóstico diferencial também de outros tripanossomatídeos americanos (SOUTO *et al.*, 1999).

Os genes do RNA ribossomal estão entre as seqüências mais comuns e conservadas encontradas na natureza. Por esta razão elas tem sido extensivamente usadas para análises filogenéticas e como sondas para diagnóstico específico (CUPOLILLO *et al.*, 1995; FERNANDES *et al.*, 1994; BRINGAUD *et al.*, 1998; BRIONES *et al.*, 1999; ZINGALES *et al.*, 1999; SOM *et al.*, 2000, DÁVILA & MOMEN, 2000). Estes genes tem sido analisados em uma grande variedade de organismos desde os protozoários até as plantas superiores, mas principalmente em parasitas metazoários da Classe Nematoda (HOSTE *et al.*, 1998;

HOMAN *et al.*, 1997; COLEMAN & MAI, 1997; GASSER *et al.*, 1997; FRITZ, 1998; BARGUES *et al.*, 2000).

Tipicamente os genes do rRNA de eucariotos são encontrados como unidades repetitivas em seqüência (100 a 200 cópias), separadas por espaços não transcritos chamados NTS (Non Transcribed Spacers) (RAMIREZ & GUEVARA, 1987; GUEVARA *et al.*, 1992). Cada unidade transcrita é composta pelos genes do rRNA 18S, 5,8S e 28S, bem como de várias regiões espaçadoras internas que são transcritas, chamadas ITS (Internal Transcribed Spacers), as quais são flanqueadas por seqüências NTS. Segundo PULLIDO *et al.* (1996), em *T. cruzi* existem aproximadamente 110 cópias deste gene por célula, as quais são encontradas em, no mínimo, 2 cromossomos distintos (CASTRO *et al.*, 1981; WAGNER & SO, 1990), separados por seqüências NTS maiores que 20 Kb (HERNÁNDEZ & CASTAÑEDA, 1983). É sabido que os NTS evoluem muito mais rapidamente que as regiões que codificam os rRNA maduros e tem sido altamente usados nas comparações de espécies fortemente relacionadas (PULIDO *et al.*, 1996)

Similarmente, os ITS são regiões transcritas, porém não traduzidas dos genes do rRNA e demonstram uma ampla variabilidade. Diferentemente dos NTS, os ITS são relativamente pequenos (aproximadamente 1kb em *Leishmania* sp. e 1.0 a 1.2kb em *T. cruzi*) e rodeados por segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR são direcionados (CUPOLILO *et al.*, 1995; MCLAUGHLIN *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1999; SOM *et al.*, 2000; DÁVILA & MOMEN, 2000).

Devido a evidência de que esta técnica pode ser potencialmente utilizada em muitas situações evolucionárias, SOM *et al.* (2000) refere-se a ela como IRT (intergenic region typing), ou seja, tipagem de região intergênica.

Enquanto a seqüência do gene do rRNA apresenta variações muito lentamente devido a pressão seletiva, em geral por inserções, deleções ou mutações, as regiões ITS que separam o rRNA 18S do rRNA 5,8S (ITS-1) e o rRNA 5,8S do rRNA 28S (ITS-2) são muito mais variáveis tanto em tamanho como em seqüência. A grande conservação dos genes de rRNA e das seqüências ITS parece variar dependendo do organismo (DÁVILA 2002). Em *T. cruzi*, assim como em outros tripanosomatídeos, as seqüências dos genes do rRNA são bem conservadas dentro das cepas da mesma espécie, o que faz este gene ser considerado um bom marcador genético (HERNÁNDEZ *et al.*, 1993). Entretanto nem os ITS, nem os NTS são conservados em tripanosomatídeos, podendo variar em comprimento e/ou seqüência dentro de uma mesma espécie, sendo portanto utilizadas como ferramentas moleculares na classificação dos parasitas (ZAVALA-CASTRO *et al.*, 1992; PULIDO *et al.*, 1996). Existem também exemplos de conjuntos distintos de genes do rRNA existindo num mesmo organismo (CUPOLILO *et al.*, 1995). Por exemplo, em *Plasmodium* sp. existem dois conjuntos bem definidos de genes do rRNA, o tipo A, expressado durante a fase assexual do ciclo de vida e o tipo S, expresso durante a esporogonia realizada quando no mosquito vetor. Os genes rRNA 18S nos membros do mesmo conjunto são idênticos, mas mostram uma variação de aproximadamente 10% entre os dois conjuntos. As seqüências ITS são idênticas em 80% a 91% das posições entre o tipo A e 75% entre o tipo S com somente 42% a 57% de identidade entre os dois conjuntos (CUPOLILO *et al.*, 1995; SOM *et al.*, 2000)

As seqüências de espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) do gene do rDNA são utilizadas como marcadores genéticos confiáveis para uma ampla gama de espécies de nematóides em virtude da baixa variabilidade intra-específica observada (POWERS *et al.*, 1997; ELBADRI *et al.*, 2002). Diferenças interespecíficas observadas no rDNA de espécies de nematóides são consistentes com aspectos morfológicos e permitem definir claramente

as distintas espécies, o que está de acordo com as teorias tradicionais de evolução conjunta (POWERS *et al.*, 1997). Entretanto, diferentes estudos têm demonstrado níveis de variações intra-individuais e/ou intraespecíficas substanciais em seqüências de ITS-1 e/ou ITS-2 para algumas espécies de artrópodes e platelmintos (HERWERDEN *et al.*, 2000).

As regiões transcritas e não codificadoras de genes rRNA (ITS) são consideradas como possuidoras de extensa variabilidade (CUPOLILLO *et al.*, 1998). Estudos recentes indicaram que, por exemplo, níveis relativamente altos de heterogeneidade nas seqüências de ITS-1 e ITS-2 podem existir entre diferentes amostras de cestodas do gênero *Echinococcus* (HERWERDEN *et al.*, 2000). Este estudo forneceu uma evidência indireta de que diferentes mecanismos de renovação de rDNA atuam sobre estes espaçadores de *Echinococcus* sp., quando comparados com nematóides.

Em *T. rangeli*, estes mecanismos permanecem pouco explorados e possivelmente o estudo de polimorfismos de tamanho e de seqüências das regiões ITS poderão trazer informações relevantes para o entendimento da variabilidade genética do parasita.

O conhecimento e entendimento da variabilidade das seqüências dos genes do rRNA de diferentes organismos é importante do ponto de vista da compreensão da evolução desta seqüência e seu uso potencial na identificação e caracterização de cepas de uma dada espécie, torna-se especialmente recomendado nos estudos epidemiológicos (ZINGALES *et al.*, 1999).

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

- Avaliar a variabilidade intraespecífica de *Trypanosoma rangeli* baseada na região intergênica (ITS) do gene do RNA ribossomal (rRNA).

2.2 - Objetivos específicos

- Padronizar a técnica da amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de *T. rangeli* utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-2.
- Amplificar, clonar e seqüenciar os produtos de amplificação da região ITS de cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas.
- Comparar as seqüências da região ITS de *T. rangeli* isolados de diferentes regiões geográficas com seqüências disponíveis no Genbank, relacionando distâncias genéticas e relações filogenéticas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Parasitas:

As diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* analisadas no presente estudo encontram-se criopreservadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Seus hospedeiros originais e suas origens geográficas estão expostos na Tabela I.

TABELA I

Cepas de *Trypanosoma rangeli* analisadas no presente trabalho, seus hospedeiros originais e sua origem geográfica.

CEPA	HOSPEDEIRO	PROCEDÊNCIA
B450	<i>Rhodnius sp.</i>	Brasil
SC 58	<i>Echimys dasythrix</i>	Brasil
SC 61	<i>Echimys dasythrix</i>	Brasil
San Agustin	Humana	Colômbia
H8 GS	Humana	Honduras
H 14	Humana	Honduras
H9	Humana	Honduras
Macias	Humana	Venezuela
Palma 2	<i>Rhodnius prolixus</i>	Venezuela
R 1625	Humana	El Salvador
Choachi	<i>Rhodnius prolixus</i>	Colômbia
D 3493	<i>Rhodnius prolixus</i>	Colômbia

Após descongelamento em banho-maria a 37°C, os parasitas foram analisados quanto a sua viabilidade por observação direta ao microscópio óptico e então transferidos para tubos de cultura com meio LIT (Liver Infusion Tryptose), acrescido de 15% de soro bovino fetal (SBF), e mantidos a 27,5°C através passagens semanais (CASTELLANI *et al.*, 1967).

3.2 - Extração de DNA:

Para a extração do DNA de *T. rangeli* foi utilizado o método do fenol clorofórmio descrito por SAMBROOK *et al.* (2001). Após lavagem da cultura de parasitas em fase exponencial de crescimento com tampão salino adicionado de fosfatos (PBS) pH 7,2 a 4°C por 2 vezes a 14000 x g. Após a lavagem, o precipitado foi adicionado de tampão de extração (10mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 25 mM EDTA e 1% SDS) acrescido de Proteinase K (20 µg/ml) e então incubado por, no mínimo, uma hora a 42°C. Para a desproteinização foi adicionado fenol neutralizado (v/v) misturando-se os tubos gentilmente por inversão por cerca de 10 minutos e, em seguida, centrifugando-se a 14.000 x g pelo mesmo tempo a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo adicionando-se igual volume de fenol-clorofórmio (v/v) misturando-se gentilmente por 10 minutos para então proceder nova centrifugação a 14.000 x g por tempo equivalente ao da mistura. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde foi adicionado um volume igual de clorofórmio, misturando-se por 10 minutos e centrifugando a 14.000 x g por mais 10 minutos. Após a transferência da fase aquosa para novo tubo, foi adicionado 1/10 do volume total contido no tubo de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e aproximadamente 2,5 vezes o volume total contido no tubo de etanol 100% previamente resfriado a -20°C para precipitação de ácidos nucleicos. O tubo foi então incubado em gelo

por 15 minutos e posteriormente centrifugado por 30 minutos a 14.000 x g a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado por 2 vezes por 10 minutos a 14.000 x g (temperatura ambiente) com etanol a 70% mantido previamente em freezer a -20°C . Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o microtubo invertido sobre papel toalha por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, o DNA extraído foi diluído em 50 μl de TE (50mM Tris, 10mM EDTA) ou em água bidestilada e desmineralizada estéril, quantificado conforme o descrito em 3.3 e posteriormente estocado a -20°C .

3.3 - Dosagem do DNA:

As amostras de DNA obtidas foram dosadas através de comparação com padrões conhecidos em eletroforese em géis de agarose a 1% corados pelo brometo de etídio. Para tanto, três microlitros de cada amostra foram diluídos em volume igual de tampão de amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25% e 30% glicerol) e aplicados no gel, o qual foi submetido a 40V (0.10 mA) por aproximadamente 1 hora em tampão TBE (Tris-HCL 89mM pH 8,0, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). A observação das bandas foi realizada com o auxílio de um transiluminador MacroVue UV20[®] (Hoefer, San Francisco), sendo os resultados fotografados.

Alternativamente, a dosagem e a avaliação do grau de pureza das amostras de DNA foi realizada através de espectrofotometria em um aparelho BioPhotometer[®] (Eppendorf, Germany), sendo o grau de pureza determinado relação da absorbância a 260/280 nm.

Todas as amostras de DNA extraídas, após quantificadas, foram aliqüotadas e armazenadas à -20°C .

3.4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR):

Para a realização do estudo comparativo das seqüências entre as diferentes cepas de *T. rangeli* a amplificação via PCR das regiões ITS-1, ITS-2 e 5,8S do gene do rRNA (Figura 3), foi realizada com os iniciadores ITS-1 (5'- GTC GTA GGT GAA CCT GCA GCT GGA TCA TT -3') e ITS-2 (5'- GCG GGT AGT CCT GCC ACA CTC AGG TCT G -3') sintetizados pela Invitrogen (São Paulo - Brasil) conforme inicialmente proposto por CUPOLILLO *et al.* (1995).

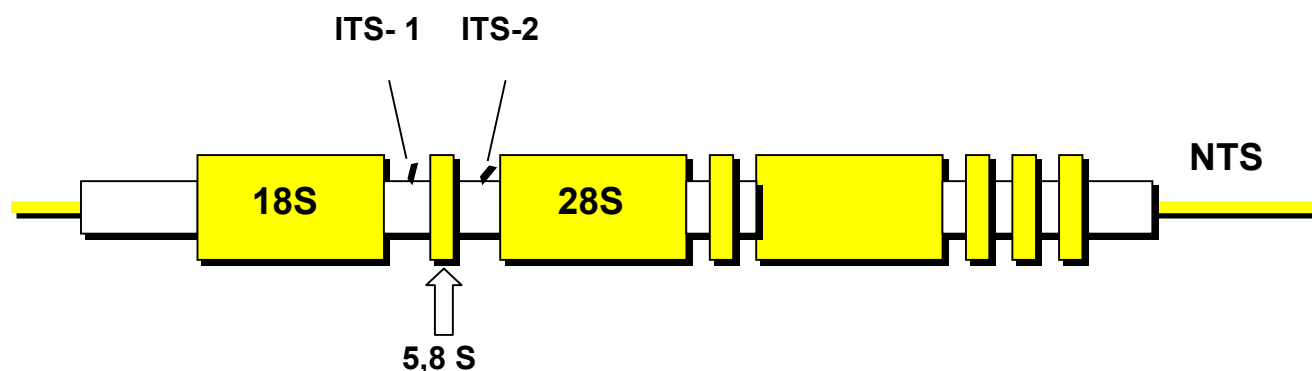


FIGURA 3: Representação esquemática do gene do rRNA demonstrando as porções 18S, 5,8S e 28S do gene, as regiões espaçadoras ITS 1 e ITS 2 e a região NTS.

Uma vez que o gene do rRNA possui variabilidade na seqüência e no tamanho comprovadas entre espécies, e mesmo entre cepas da mesma espécie, foi necessária a realização de padronização da reação de PCR. Para tanto, foram testados inicialmente 12 diferentes tampões de reação, os quais diferem nas concentrações de KCl e MgCl₂ e no pH (Tabela 2).

Durante a padronização também foi utilizado o esquema de amplificação cujas temperaturas de ligação dos iniciadores decrescem a cada ciclo (“touch down” PCR) o que permite abranger uma faixa de temperaturas ótimas de ligação dos iniciadores na fita molde

quando existe, ou é esperada uma variabilidade de seqüência nesta. Além disso, foram realizados ensaios utilizando gradientes de temperatura variando de 45°C a 70°C.

Em cada reação utilizou-se de 10 a 30ng de DNA molde, 1U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Porto Alegre), 2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (Invitrogen, La Jolla), 10pmoles de cada iniciador na presença da solução tampão (15mM MgCl₂, 250mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,8) em um volume total de 20µl/reação, as quais foram realizadas em termocicladores Mastercycler Gradient[®] (Eppendorf, Hamburg).

Cada conjunto de reação foi acompanhado de um controle negativo, que consiste em todos os reagentes necessários à amplificação à exceção do DNA molde e de um controle positivo que consiste na amplificação da região ITS da cepa Y de *T. cruzi* (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) mantida conforme o descrito em 4.1.

Todos os procedimentos de pré e pós-amplificação foram realizados em locais diferentes, não compartilhando materiais, reagentes e/ou equipamentos. Após a PCR, o material amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio conforme descrito em 3.3.

TABELA II

Formulação dos 12 diferentes tampões* utilizados nas otimizações das reações de PCR para amplificação das regiões ITS do gene do rRNA.

Tampão	Tris-HCl pH 8,3	Tris-HCl pH 8,8	Tris-HCl pH 9,2	MgCl₂	KCl
1	100mM	-	-	15mM	250mM
2	100mM	-	-	15mM	750mM
3	100mM	-	-	35mM	250mM
4	100mM	-	-	35mM	750mM
5	-	100mM	-	15mM	250mM
6	-	100mM	-	15mM	750mM
7	-	100mM	-	35mM	250mM
8	-	100mM	-	35mM	750mM
9	-	-	100mM	15mM	250mM
10	-	-	100mM	15mM	750mM
11	-	-	100mM	35mM	250mM
12	-	-	100mM	35mM	750mM

* adaptado do kit Opti-Prime[®] (Stratagene, Califórnia)

3.5 - Purificação e clonagem dos produtos de PCR:

Os produtos de PCR obtidos com os iniciadores ITS-1 e ITS-2 foram resolvidos em géis de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve[®], Rockland) a 1%, excisados e purificados utilizando-se os kits GFX[®] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amershan Biosciences) ou QIAquick Gel Extraction Kit[®] (Qiagen, Valencia). Posteriormente, os produtos purificados foram clonados utilizando-se o kit TA-TOPO[®] (Invitrogen) segundo especificações do fabricante.

3.6 - Seqüenciamento do DNA:

O seqüenciamento das regiões ITS-1, ITS-2 e 5,8S do gene do rRNA foi realizado utilizando-se produtos de PCR puros e clonados em TA-TOPO em um equipamento MegaBace 1000[®] DNA Analysis System, realizando-se a reação de seqüenciamento com o kit DYEnamic[®] ET dye terminator (Amershan Biosciences) conforme especificações do fabricante. Para a reação de seqüenciamento utilizou-se os iniciadores M13-foward (CGC CAG GGT TTT CCC AGT GAC) e M-13 reverse (TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C) para produtos clonados, e os iniciadores ITS-1, ITS-2, ITS-1BR (5'- TTG CTG CGT TCT TCA ACG AA -3') e ITS-2AF (5'- CAT TTC GTT GAA GAA CGC AGC-3') (DÁVILA, 2002) tanto para os produtos clonados como para o seqüenciamento direto de produtos de PCR. Os dois últimos iniciadores (ITS-1BR e ITS-2AF) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alberto Dávila (Fiocruz – Rio de Janeiro) e são direcionados a regiões internas da subunidade 5.8S, tendo sido utilizados para o seqüenciamento completo da unidade de repetição conforme demonstrado na Figura 4.

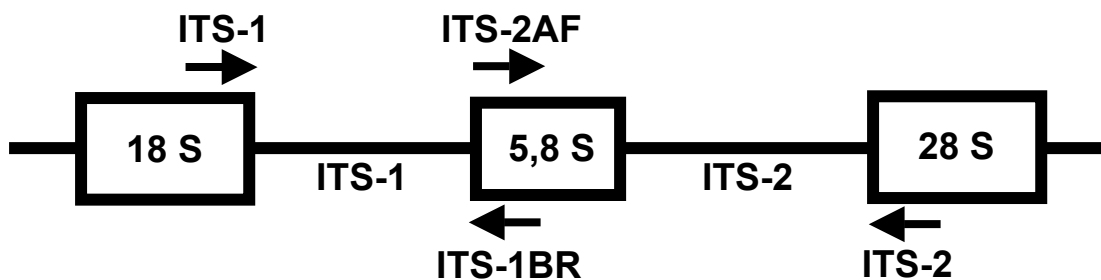


FIGURA 4: Representação esquemática do gene do rRNA, assinalando as sub-unidades 18S, 5,8S e 28S, as regiões espaçadoras transcritas (ITS) e os sítios de ligação dos iniciadores utilizados na amplificação e/ou seqüenciamento da unidade de repetição completa do gene.

3.7 - Análise das seqüências obtidas:

As seqüências obtidas das diferentes cepas de *T. rangeli* foram inicialmente comparadas com seqüências disponíveis do banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para a comprovação da identidade das seqüências obtidas.

A análise da qualidade e montagem dos fragmentos obtidos foram feitas utilizando-se o pacote Phred/Phrap/Consed[®] (<http://www.phrap.org>) e o programa GELASSEMBLE do pacote GCG Wisconsin (<http://www.accelrys.com>), respectivamente. Após nova comparação com o banco de dados GenBank através da ferramenta básica Blast, o alinhamento das seqüências foi feita utilizando-se o software ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). Depois do alinhamento, as seqüências foram comparadas pelos métodos de bootstrapped máxima parcimônia (200 replicatas) e Neighbour-joining (1.000 replicatas) usando o software MEGA, version 2.1 (KUMAR, TAMURA & NEI, 1993).

Seqüências do ITS das cepas AM11 de *T. rangeli* (Acesso no GenBank AF362832), Esmeraldo (AF362827) e 994 (AF362829) de *T. cruzi* e *Leishmania braziliensis*, *L. (Mexicana) amazonensis*, *L. tropica*, *L. major* e *L. donovani* (AJ300484, AF339753, AJ300485, AJ300481 e AJ276260) que foram obtidas do GenBank e incluídas no presente estudo para comparação. A seqüência dos espaçadores ITS e a seqüência da subunidade 5,8S do rRNA de *Crithidia fasciculata* (Y00055) foi incluído como “outgroup” na análise comparativa, uma vez que esta espécie é filogenicamente próxima a *T. rangeli*.

Após a análise dos resultados, todas as seqüências obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank, obtendo os seguintes números de acesso: AY230233, AY230234, AY230235, AY230236, AY230237, AY230238, AY230239, AY230240.

4- RESULTADOS

A padronização da técnica visando a amplificação via PCR das regiões ITS que flanqueiam a subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *T. rangeli* foi realizada utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-2, inicialmente propostos para a amplificação da mesma região em amostras de *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 1999), com pequenas modificações. Da mesma forma, as condições de reação utilizadas inicialmente foram as mesmas propostas para *T. cruzi*, tendo sido gentilmente cedidas pela Dr^a. Regina Mangia (Fiocruz/RJ).

Objetivando amplificação e análise das seqüências dos espaçadores ITS-1, ITS-2 e subunidade 5,8S de *T. rangeli*, optou-se primeiramente em implementar e padronizar a técnica em nosso Laboratório utilizando-se DNA de *T. cruzi* e, posteriormente, inserir o DNA de *T. rangeli* no protocolo padronizado.

Utilizando o protocolo dos 12 tampões como especificado no item 3.4 do Material e Métodos e promovendo alterações no esquema de amplificação inicialmente proposto para *T. cruzi* foi observada a amplificação de bandas de 1,2 Kb a partir do DNA da cepa Choachi de *T. rangeli*. Após inúmeros testes utilizando esquemas de amplificação distintos, foi padronizada uma reação de PCR utilizando “touch down” composta de 15 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto com temperaturas de ligação dos iniciadores reduzindo de 60°C para 45°C em cada ciclo e 1 minuto a 72°C, seguidos de 15 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com um passo de 72°C por 5 minutos.

Utilizando o protocolo acima descrito, observou-se a formação de um produto de amplificação forte e de tamanho compatível com o esperado (1,2 Kb) quando utilizados os tampões 5, 6 e 9 (Figura 5). Dentre estes, o que propiciou o produto de amplificação de

maior intensidade foi o tampão 5 cuja concentração 10x possui 15mM MgCl₂, 250mM KCl e 100mM Tris-HCl pH 8,8 (Tabela 2).

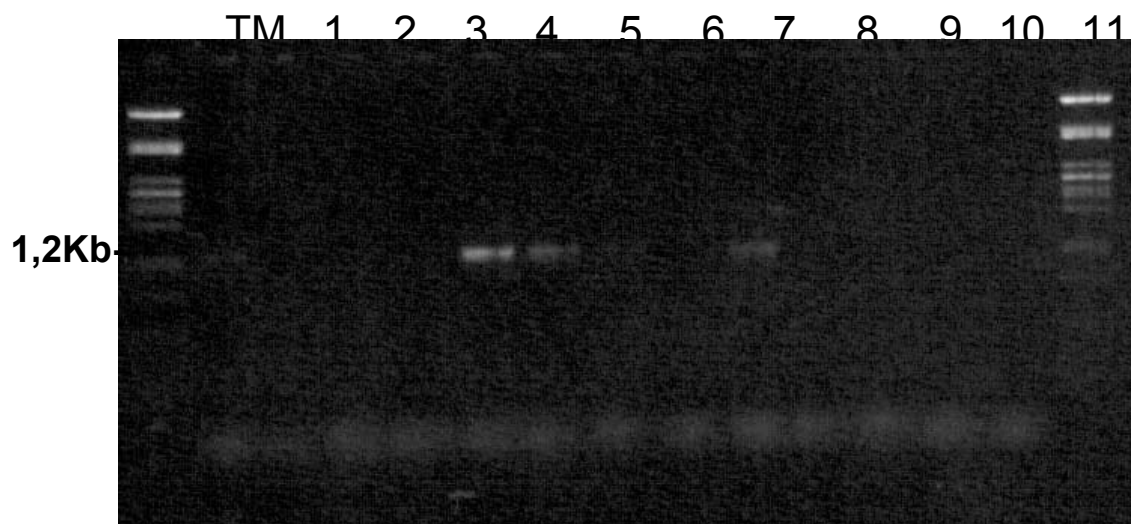


FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de *Trypanosoma rangeli* utilizando o protocolo dos 12 tampões (canaletas 1-12). Canaleta 13= Controle negativo (sem adição de DNA), TM= Padrão de tamanho molecular (λ DNA digerido com *Pst*I).

Tendo-se padronizado as condições de PCR para amplificação da região ITS do gene do rRNA do *T. rangeli*, a reação foi realizada com o DNA extraído das cepas de *T. rangeli* constantes na Tabela 1.

Em função dos resultados obtidos durante os experimentos de padronização, foram testados em paralelo os tampões 5 e 9 e um esquema de amplificação que objetivou

aumentar a estringência da reação. Utilizando uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos compostos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C e finalizando com um passo de 72°C por 5 minutos, observamos que o tampão 9 (100mM Tris-HCL pH 9,2; 15mM MgCl₂, 250mM KCl) e as condições acima descritas mostraram-se mais eficientes na geração de produtos de amplificação das distintas cepas, observando-se entretanto a formação de bandas extras com tamanhos inferiores a 1,2 Kb (Figura 6).

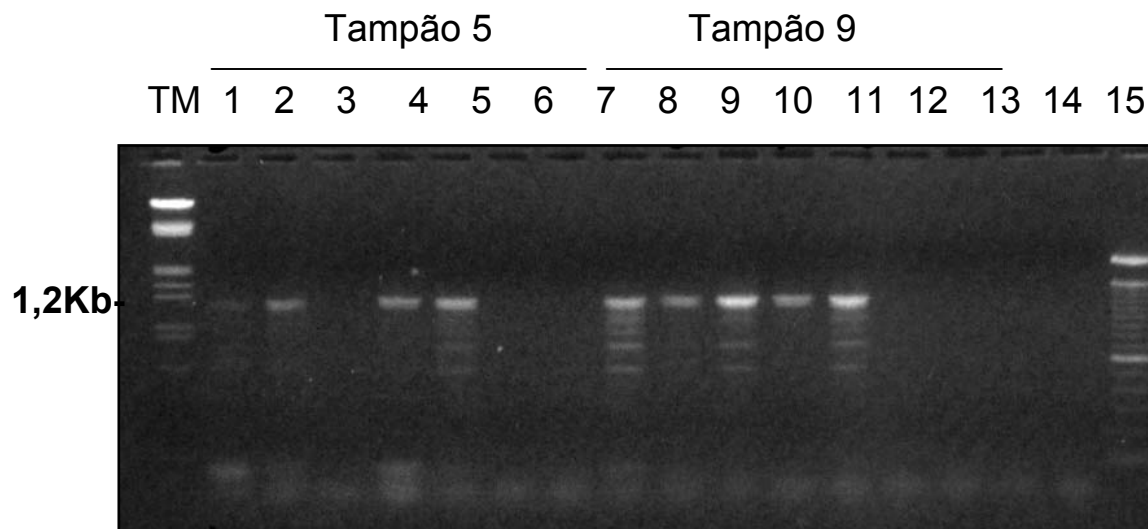


FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de *Trypanosoma rangeli* de diferentes regiões geográficas utilizando os tampões 5 (canaletas 1-7) e 9 (canaletas 8-14). Canaletas 15 e 16= Controles negativos dos tampões 5 e 9 (sem adição de DNA), TM= Padrão de tamanho molecular (λ DNA digerido com *Pst*I). Canaletas 1 e 8= Cepa Choachi; canaletas 2 e 9= cepa Palma 2, canaletas 3 e 10= cepa H8GS,

canaletas 4 e 11= cepa D3493, canaletas 5 e 12= cepa Macias, canaletas 6 e 13= cepa SC58 e canaletas 7 e 14= cepa SC61. A= Padrão de tamanho molecular 100bp-ladder[®] (Gibco).

Com o intuito de averiguar se as bandas de tamanho inferior a 1,2 Kb observadas na Figura 6 eram devidas a ligações inespecíficas dos iniciadores, foi realizado um PCR utilizando um gradiente de temperatura disponível nos termocicladores Mastercycler Gradient (Eppendorf), tendo a temperatura de ligação dos iniciadores variado de 45°C a 70°C, em incrementos de $\pm 1^\circ\text{C}$. Padrões distintos de amplificação foram observados para cada cepa, sendo alguns representados na Figura 7.

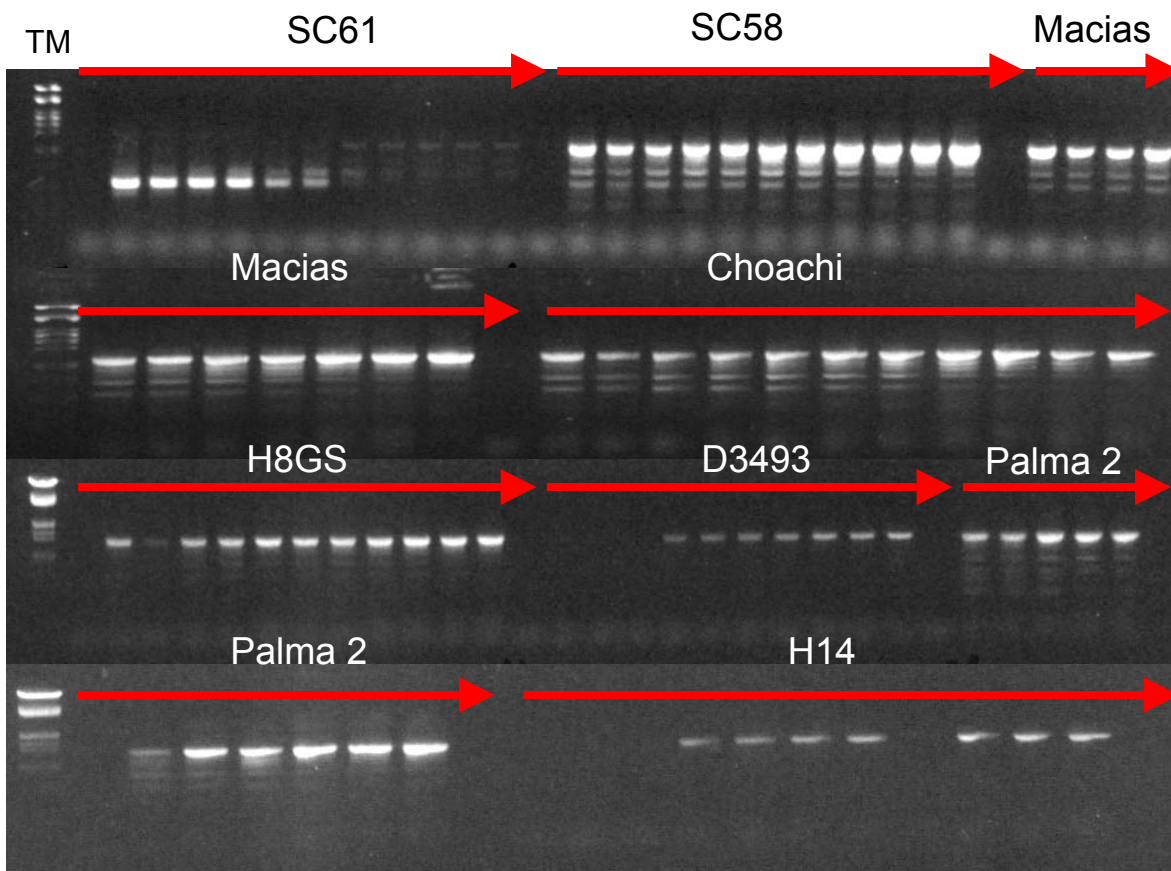


FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio representando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas utilizando um gradiente de temperatura (45°C a 70°C). TM= Padrão de tamanho molecular (λ DNA digerido com *Pst*I). Setas vermelhas indicam o aumento do gradiente de temperatura.

Confirmando o tampão 9 como sendo o tampão ideal para a amplificação das regiões ITS das diferentes cepas de *T. rangeli*, os resultados apresentados na figura 7 demonstraram que as bandas com tamanho inferior a 1,2Kb são amplificadas mesmo em temperaturas elevadas, o que determina uma forte especificidade de ligação dos iniciadores. Estes resultados também revelaram que a utilização de temperaturas iguais ou superiores a 60°C para a ligação dos iniciadores ITS-1 e ITS-2 na fita molde geravam produtos de amplificação de maior intensidade além da redução das bandas inespecíficas. Baseados nesta observação, adotou-se a temperatura de 60°C como temperatura padrão de ligação dos iniciadores na reação de amplificação da região ITS do gene do rRNA de *T. rangeli*.

Interessantemente, não foi possível obter produtos de amplificação de 1,2Kb da cepa SC61 de forte intensidade, independente da temperatura de ligação dos iniciadores, do tampão utilizado ou mesmo da adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ou soro albumina bovina (BSA), produtos estes comumente utilizados com o intuito de facilitar a reação de PCR. Devido ao pouco material amplificado (Figura 7), não foi possível realizar o sequenciamento das regiões ITS desta cepa.

Na seqüência, os produtos de amplificação das regiões ITS do gene do rRNA de cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas foram purificadas conforme o descrito no item 3.5 do Material e Métodos. A purificação mostrou-se eficiente ao revelar a eliminação das bandas inferiores a 1,2 Kb, permitindo a clonagem e seqüenciamento das amostras (Figura 8).

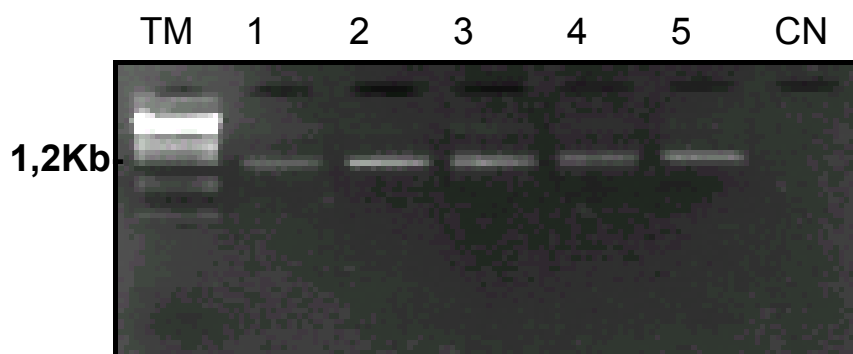


FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas após a purificação. Canaleta 1 = cepa H14; Canaleta 2 = cepa H9; Canaleta 3= cepa Palma 2; Canaleta 4= cepa SC58; Canaleta 5= cepa San Agustin; CN = controle negativo (sem adição de DNA), TM= Padrão de tamanho molecular (λ DNA digerido com *Pst*I).

Após a clonagem, a comprovação da presença dos insertos no vetor foi realizada através da digestão do DNA plasmidial com a enzima *Eco*RI, conforme o descrito em Material e Métodos (item 3.5). Foram considerados positivos os clones que, após a digestão, apresentaram em eletroforese em géis de agarose a presença de uma banda de cerca de 1,2 Kb correspondente ao fragmento clonado e uma banda de aproximadamente 4,0 Kb correspondente ao plasmídeo pCR[®] 4-TOPO[®] (Figura 9).

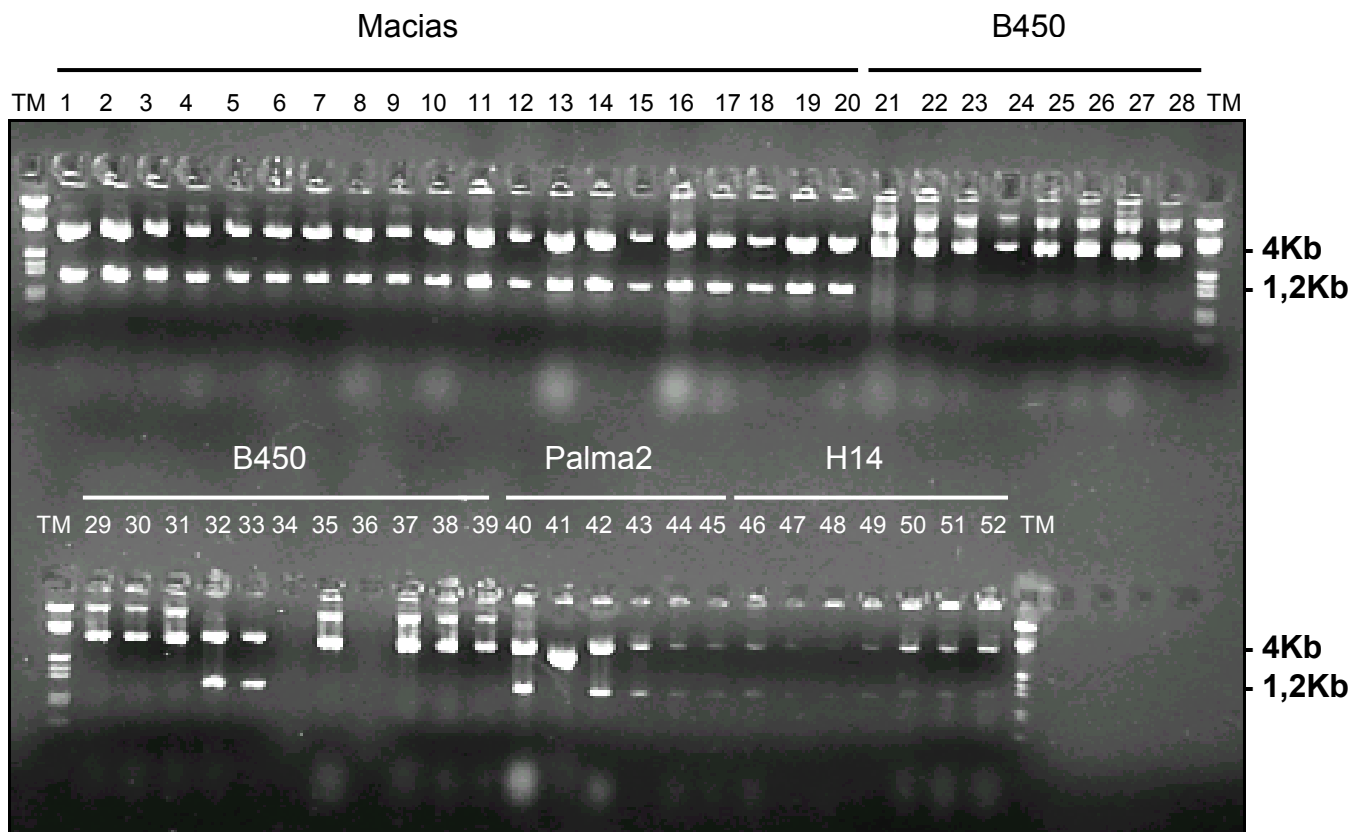


FIGURA 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio representando os produtos da digestão do DNA do plasmídeo pCR[®]4-TOPO[®] pela enzima *EcoRI*, revelando a presença de insertos correspondentes a região ITS de diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli*. TM= Padrão de tamanho molecular (λ DNA digerido com *PstI*).

Como podemos observar na figura acima, a despeito do crescimento de colônias em meio sólido, nem todos os clones analisados possuíam o inserto desejado. Uma vez selecionados, os clones positivos foram crescidos e, após a extração o DNA plasmidial foi utilizado nas reações de seqüenciamento.

As reações de seqüenciamento foram realizadas tanto com o DNA clonado quanto com os produtos de PCR purificados, diferindo estas reações em seu volume final, tendo sido de 20 μ l para o DNA provindo da clonagem e 10 μ l do DNA oriundo da reação de PCR. Além disso, o esquema de amplificação utilizado na reação de seqüenciamento também foi modificado a partir do protocolo preconizado pelo fabricante, com o intuito de maximizar a eficiência do mesmo.

Inicialmente utilizamos na reação de seqüenciamento um esquema padrão composto de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Devido à baixa qualidade das seqüências obtidas, alterou-se o programa inserindo-se uma temperatura inicial de 94°C por 25 segundos, seguidos de 30 ciclos com temperaturas de 94°C por 15 segundos, 58°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto. O seqüenciamento destas amostras revelou uma melhora significativa na qualidade, mas ainda fora dos padrões desejados. Optou-se então por inserir ao programa a condição de iniciação de alta estringência (“hot start”). O “hot start” consiste em utilizar uma temperatura de desnaturação inicial (94°C) por 4 minutos com a reação contendo apenas água e o DNA. Após o período de desnaturação, adicionam-se os iniciadores, os dideoxinucleotídeos marcados e a enzima *Taq* DNA polimerase, seguindo-se o programa de amplificação anteriormente descrito. Esta última condição revelou resultados satisfatórios tendo sido adotada para o seqüenciamento das amostras de *T. rangeli*.

Devido ao tamanho da seqüência (1,2Kb) e a limitação do seqüenciador automatizado, que possui capacidade de gerar seqüências com boa qualidade em torno de 500 a 600pb, foi necessário à utilização de iniciadores internos (ITS-1BR e ITS-2AF) direcionados à subunidade 5,8S do gene do rRNA, conforme o demonstrado na Figura 4. Mesmo com a utilização de iniciadores internos, com as modificações na reação e no

seqüenciamento propriamente dito, não foi possível obter seqüências completas e/ou de boa qualidade dos espaçadores ITS-1, ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA das cepas SC61, San Agustín, H14 e H8GS de *T. rangeli*.

As seqüências consenso obtidas para as cepas SC58, Palma 2, H9, D3493, Macias, R1625, B450 e Choachi de *T. rangeli* foram comparativamente analisadas conforme o descrito no item 3.7 do Material e Métodos, revelando um tamanho que variou de 1.224 a 1.309pb. As seqüências da região ITS-1 das cepas de *T. rangeli* analisadas apresentaram um tamanho variando entre 405 a 417pb, a região codificante da subunidade 5,8S do gene do rRNA variou de 173 a 175pb e a região de ITS-2 de 614 a 675pb. Sendo assim, o comprimento total das seqüências obtidas e analisadas sempre esteve em torno de 1,2kb, ou seja, as seqüências das cepas de *T. rangeli* oriundas de diversos hospedeiros e regiões geográficas mostraram-se bastante conservadas em relação ao tamanho. Quando comparadas com as seqüências de Esmeraldo e Tc994 de *T. cruzi* obtidas no GenBank, observou-se um polimorfismo no tamanho da seqüência, principalmente, em relação à cepa Tc994 (Figura 10).

O alinhamento das seqüências revelou um conteúdo médio de G/C de 41.6% entre as cepas de *T. rangeli* analisadas e, independente da cepa, a comparação das seqüências nucleotídicas dos produtos de amplificação obtidos demonstrou um baixo polimorfismo intra-específico (Figura 10).

A análise exclusiva das seqüências do gene da subunidade 5,8S do rRNA mostrou uma alta conservação entre as cepas de *T. rangeli*. Comparando a subunidade 5,8S do gene do rRNA das cepas de *T. rangeli* com cepas de *T. cruzi*, observamos uma conservação mesmo em nível interespecífico (Figura 10).

Polimorfismos de mononucleotídeos (*single nucleotide polymorphisms* - SNP's), devidos a alterações e/ou inserções de bases, foram observados na seqüência do gene da subunidade 5,8S do rRNA nas cepas de *T. rangeli* analisadas (Figura 10). A análise comparativa revelou que a cepa Palma 2 possui substituições C/T e A/T nas posições 470 e 497. As cepas D3493 e B450 revelaram possíveis inserções de mononucleotídeos nas posições 497 (C) e 592 (A). Além disso, deleções de nucleotídeos foram observadas na cepa Palma 2 (bases 443 e 510), SC58 (base 508) e AM11 (base 387). A descrição detalhada destes polimorfismos está apresentada na Tabela 3.

A análise comparativa das regiões ITS-1 e ITS-2 revelou um baixo polimorfismo de seqüência entre as cepas de *T. rangeli* analisadas, entretanto, quando estas seqüências foram comparadas com as seqüências homólogas das cepas Esmeraldo e Tc994 de *T. cruzi* observou-se um alto grau de variabilidade interespecífica (Figura 10). Os SNP's presentes nas regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 podem ser constatados na Tabela 3.

Além dos eventos de inserção e/ou deleção localizados nas regiões ITS-1 e ITS-2 das cepas analisadas, foram observadas diversas repetições nucleotídicas de motivos (TA, AT, TG, GT, TT, AA, GCA, CCT e CTT) e comprimentos variáveis. Com relação estes eventos, destacam-se as cepas B450 e AM11 de *T. rangeli*, ambas originárias da região Amazônica Brasileira, onde observamos, principalmente na segunda uma variação de seqüência nas regiões ITS-1 e ITS-2, quando comparadas às demais cepas do parasita. Interessantemente, a cepa AM11 de *T. rangeli* possui nas regiões ITS-1 e ITS-2 fragmentos cuja seqüência possui maior similaridade com as cepas de *T. cruzi* do que com as cepas de *T. rangeli* (Figura 10).

FIGURA 10: Alinhamento das seqüências da região ITS do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e hospedeiros pelo software ClustalX. Os nucleotídeos em itálico indicam os iniciadores utilizados para amplificação via PCR da região ITS das cepas de *T. rangeli*. Nucleotídeos em cor azul indicam a região correspondente ao espaçador ITS-1, os em cor vermelha indicam a subunidade 5,8S do rRNA e os em cor verde a região do espaçador ITS-2. Os nucleotídeos sublinhados e em cores diferentes da seqüência onde estão inseridos demonstram diferenças entre as seqüências analisadas. Fragmentos contidos em caixas indicam regiões de microsátélites ou de repetições nucleotídicas e os hífens indicam espaços inseridos pelo software ClustalX para permitir o alinhamento.

Palma2 -----GTGTGTACCC 10
 SC58 -----GTAGGTGAACCT 12
 Choachi -----GTAGGTGAACCT 12
 H9 -----GTAGGTGAACCT 12
 D3493 -----GTAGGTGAACCT 12
 Macias -----GTAGGTGAACCT 12
 R1625 -----GTAGGTGAACCT 12
 B450 -----GTAGGTGAACCT 12
 AM11 -----
 Esmeraldo -----
 Tc994 GCTCAACCACCACCACCCTACTACTACTACTACGCCATTTCTACTAAAACAATATATAA 60

Palma2 GCAGGTGGATCTTTTTCGAGGATTTCTTAATACCCTATAATACA**TGTGTGTGT**TATATAT 70
 SC58 GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 Choachi GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 H9 GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 D3493 GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 Macias GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 R1625 GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATYTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 B450 GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTTCATAAATACCCTATAATACA**TGTGTGCGT**TATATAT 72
 AM11 -----T**TCCGATGATTT**CATATAT 19
 Esmeraldo -----
 Tc994 TATATATCTACTCTC**ACGGACTGTGCTACTACTGCTTTTGCTGCTGCTGCTGCTGCT**GTGTGG 120

Palma2 ATATATATATATATATATATA--T--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 125
 SC58 ATATATATATATATATATATA---T--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 125
 Choachi ATATATATATATATATATATATAT--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 129
 H9 ATATATATATATATATATATA---T--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 125
 D3493 ATATATATATATATATATATATAT--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 129
 Macias ATATATATATATATATATATATAT**AT**GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 131
 R1625 ATATATATATATATATATATATA--T--GTGCGCATAACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 127
 B450 ATATATATATATATATATATATATAT-----GTGCGCGTACATGC-ATGCGAGAGGAACAACCTGT 119
 AM11 **ACATGTATGTGTGT**-----**TATACACATAC**-**ACGCGAGAGGAACA**---- 59
 Esmeraldo -----TTCCGATGATTTTCATATATAC-ATGT---ATGTGTGT-TAT 36
 Tc994 AGGGCGGGGGGACGAAAGCCGTA**GTGTCGTTGTGCGTGTGATGTGGAATTTGTTG**-TTT 179

Palma2 GATGACTCCACAAGGA**G**AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 185
 SC58 GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 184
 Choachi GATGACTCCACAAGGG-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 188
 H9 GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 184
 D3493 GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 188
 Macias GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 190
 R1625 GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 186
 B450 GATGACTCCACAAGGA-AAAACAAAAAGCGCACCACGTTATATACCACACATTTGTGTGTA 178
 AM11 -**AAAAA**CACACT**TGCTCC**ACAAAAA---**AGCACAAC**ATATA-----A 99
 Esmeraldo ACACATACACGCGAGAGGAACAAAAA---ACACACTGGCTCCACAAAAAAGCACAAACAT 95
 Tc994 AGTAGTGTGGTGAAAGGAGAAGAGAGGGGGGGGGTTTAGAGAGAGACAGGGGGA 239

Palma2 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 245
SC58 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 244
Choachi TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 248
H9 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 244
D3493 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 248
Macias TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 250
R1625 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 246
B450 TAATGTGTATGTGTGTGTGTGTACTTTGTGGTTTTTGTGTCTCTGTGTGTTGCGTCCTCT 238
AM11 CAATATGTGTATGTGTGTGTACG-TTTGTGAATTTTGT-----CTATGTGTTGTGTCCTCT 153
Esmeraldo ATAACAATATGTGTATGTGTGTGTACGTTTGTGATTTTGTCTATG--TGTTGTGTCCTCT 153
Tc994 GGAAATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC-TGCTGC-TTCTCT 297

Palma2 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 299
SC58 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 298
Choachi TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 302
H9 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 298
D3493 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 302
Macias TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 304
R1625 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 300
B450 TCGCACCAAGA--TTTGCAC-GCACATGTGTGCATGCATATGTACTATA---TATTATGT 292
AM11 TCGCACCAAGA--TTCGCAC-GCACATGCATGCATATATATA-TATA---TAT----- 201
Esmeraldo TCGCACCAAGA--TTCGCAC-GCACATGCATGCATATATATA-TATA-----TGT 201
Tc994 TCGCACTGATACATCCACACTGTACGTGTAAGCATATATATATGTG-TATAATATATATATTAT 356

Palma2 ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 338
SC58 ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 337
Choachi ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 341
H9 ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 337
D3493 ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 341
Macias ACATATGTGTGTATGTGTGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 343
R1625 ACATATGTGTGTATGTGCGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 339
B450 ACATATGTGTGTATGTGTGTG-----TAAAAAAAAAAACCTACT 331
AM11 ATGTGTGTGTGTATGTGTGTG-----TA---AAGGAAACAATACT 237
Esmeraldo GTGTGTGTATGTGTGTGTA-----AAGAGAACAATACT 233
Tc994 ACATATATATATATATATATACTTGCACGTTACACAGTGTGTTGTGTAGAAAAATGTAAT 416

Palma2 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 380
SC58 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 379
Choachi TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 383
H9 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 379
D3493 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 383
Macias TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 385
R1625 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 381
B450 TGCCGCTTGACTTCGCAATATA--TACATATACTACACCACTC-----A 373
AM11 TGCCGCTTGACTTCGCAATATACATATATATATATATATACACA-----A 281
Esmeraldo TGCCGCTTGACTTCGCAATATACATATATATATATATATACACA-----A 277
Tc994 TGCCGCTTGACTTCGTG-TGTGCACATAT-TATAATATGCGTATTTTCGTGCGTGTGGTTTA 474

Palma2 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 415
SC58 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 412
Choachi CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 416
H9 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 412
D3493 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 416
Macias CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 418
R1625 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 414
B450 CACTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGT----GTGTGT-----CTATAT----- 406
AM11 CACTCGCTGTGCGT-ATATATAT-----ATATAT-----GTATAT----- 315
Esmeraldo CACTCGCTGTGCGT-ATATATAT----ATATAT-----GTATAT----- 311
Tc994 TATTTAATATATAT-ATATATATTTATTTATATATCCGCACGCTTTGCGTGTGTTTTTGTG 533

Palma2 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACG-GTCGCGACGGCTGACTAGGCTTCCTATC 470
SC58 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 470
Choachi ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 474
H9 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 470
D3493 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 474
Macias ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 476
R1625 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 472
B450 ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 462
AM11 ----GCGTCGGGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 371
Esmeraldo ----GCGTCGTGAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 367
Tc994 TGCCGCGTTGTAAAGCACGGCCCAAACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT 593

Palma2 TCGTCGCAGACCGCAGCAAAGAGC-GAAAAAGTGGTATCA-TTGCAGAATCATTCCAATT 528
SC58 TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCA-TTGCAGAATCATTC-AATT 527
Choachi TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 532
H9 TCGTTGAAGAACGCA-CAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAKAATCATTC-AATT 527
D3493 TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCCGATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 533
Macias TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGCATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 534
R1625 TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 530
B450 TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 520
AM11 TCGTTGAAGAACGCA-CAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 428
Esmeraldo TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 425
Tc994 TCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGC-GATAA-GTGGTATCAATTGCAGAATCATTC-AATT 650

Palma2 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 587
SC58 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGtCATCCCCGTGCA 586
Choachi ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 591
H9 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 586
D3493 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 592
Macias ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 593
R1625 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGARAAGCTCCTTTCGAGTCATCCCCGTGCA 590
B450 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGTCATCCCCGTGCA 581
AM11 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-TTTCGAGGCATCCCCGTGCA 487
Esmeraldo ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-CTCAGAGTCATCCCCGTGCA 484
Tc994 ACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC-CTCAGAGTCATCCCCGTGCA 709

Palma2	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	645
SC58	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	644
Choachi	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	649
H9	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	644
D3493	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CC-ACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	649
Macias	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	651
R1625	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	648
B450	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAA	CCCACAAAACA	TG-TGTGTGTGTGTG	640
AM11	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAAAAC	CCC <u>G</u> CATGA	<u>GG</u> - <u>GGG</u> GACCATGGG	547
Esmeraldo	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAATTA	CCCCTACTCTA	CAACGCATGCATTCA	543
Tc994	TGCCATATTTCT-CAGTGTCTGAACAC	AAAAATTA	CCCCTACTCTA	CAACGCATGCATTCA	768

Palma2	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	<u>T</u> -GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTT	<u>G</u> TG	698
SC58	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	696
Choachi	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	701
H9	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	696
D3493	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	701
Macias	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	703
R1625	T-----GTG----	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCGTGTTTT	<u>G</u>	696
B450	T-----GTGTGTG	CATATTTTTTAC	--GTGTGTGCACAC	-GCGCGGCACGTCG <u>AG</u> TT	<u>GA</u>	692
AM11	TTATGGATATATA	TATATATATAT	<u>CGGCATCTACGTTTT</u>	<u>G</u> TGCA	<u>CGGT</u> GTCGTGTTTTG	607
Esmeraldo	TT-----GTGTGTG	TGTGTGTGGGTGGGGGAAAT	GCAA-ACGCAAAAAAGAGAGCCCTT	<u>G</u>	598	
Tc994	TT-----GTGTGTG	TGTGTGTGGGTGGGGGAAAT	GCAA-ACGCAAAAAAGAGAGCCCTT	<u>G</u>	823	

Palma2	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATACACATGCAGAG	<u>C</u> AGCCC	752
SC58	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	<u>TA</u> -----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	751
Choachi	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	<u>TA</u> -----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	756
H9	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	749
D3493	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	754
Macias	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	756
R1625	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATACACATGCAGAG	-AGCCC	749
B450	TGGGAAATGTGTATATG	TATA-----TATATATATATA	-----CATATGCACATGCAGAG	-AGCCC	745
AM11	TGGGAAATGTGTATAT	<u>ATG</u> -----TATATATAT	<u>GC</u> A-----CATGCAGAG	-AGCCC	652
Esmeraldo	GGGAGACATTACGGATG	AAGCGCCCGCCCATGCGT	-CGTATATATAATAATAATAATA	<u>A</u>	657
Tc994	GGGAGACATTACGGATG	AAGCGCCCGCCCATGCGT	-CGTATATATAATAATAAGTAATAT	<u>A</u>	882

Palma2	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCA	<u>GAGCG</u> ACGCGATGATCCGCTCCGGCG	-TGTGTGT	811
SC58	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCA	<u>GAGC</u> -ACGC-ATGATCCGCTCCGGTG	-TGTGTGT	808
Choachi	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCA	<u>GAGC</u> -ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TGTGTGT	813
H9	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCACAGC	-ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TGTGTGT	806
D3493	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCACAGC	-ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TTTGTGT	811
Macias	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCACAGC	-ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TTTGTGT	813
R1625	CTGGGGATTACGATGAAGCGCGCACAGC	-ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	<u>C</u> TTTGTGT	807
B450	CTGGGGATTACGGATGA	<u>CGCGCGCA</u> AAGC-ACGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TTTGTGT	802
AM11	CTGGGGATTACGGATGA	AAGCGCGCACAGC- <u>G</u> CGC-ATGATCCGCTCCGGCG	-TTTGTGT	709
Esmeraldo	AATATATATACGTGCGCCGTCTGTGGTGGT	----GC-ATGATCCGCTCCGGCG	-CTTGTGT	712
Tc994	AATATATATACGTGCGCCGTCTGTGGTGGT	----GC-ATGATCCGCTCCGGCG	-CTTGTGT	937

Palma2	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	864
SC58	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	861
Choachi	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	866
H9	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	859
D3493	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	864
Macias	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	866
R1625	GTGTTTTCTCTGTTTTT-TTATCTTCCCTCTTCTCT	CCT-----CCTCCTCCTCCTCCT	860
B450	GTGTTTT <u>G</u> TCTGTTTTT <u>G</u> TAT <u>G</u> TT <u>G</u> CT <u>G</u> TT <u>G</u> CT <u>G</u> CTC <u>GCGGGG</u> CCTCCT <u>G</u> CT <u>C</u> CT <u>G</u> C		862
AM11	GTGTT <u>C</u> TCT <u>T</u> TGTTTT <u>C</u> -TCTCTTCCCCCTCCTCA	ACT-----CCTCCTCCTTCTCT	762
Esmeraldo	GTGTGTT---TGTACATAACATG-GCATGTGTGTAT	GTG-----TATGTGTAAT	757
Tc994	GTGTGTT---TGTACATAACATGTGCATGTGTGTAT	GTG-----TATGTGTAAT	982

Palma2	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	901	
SC58	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	898	
Choachi	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	903	
H9	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	896	
D3493	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	901	
Macias	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	903	
R1625	CCTCCTCCT	-----CTTCTTCTTTTTCTTTTT	-----CTTCTT	-----CTCT	897	
B450	<u>CTGCCTCCTGGTTGGGTGCTTTGTTGTTTTTGC</u> TT <u>G</u> TT <u>G</u> CT <u>G</u> CTT <u>GCTGCATG</u> CT <u>GC</u>				922	
AM11	CCTCCT <u>TTT</u>	-----CT <u>C</u> CTT <u>C</u> CCCTT <u>A</u> TTT	-----CTCCCC	<u>AC</u>	<u>ATA</u>	802
Esmeraldo	ATATATATA	-----TATATATATATATATGT	-----ATGCC	-----ATAT	793	
Tc994	ATATATATA	-----TATATATAT	-----GT	-----ATGCC	1012	

Palma2	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	959	
SC58	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	956	
Choachi	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	961	
H9	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	954	
D3493	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	959	
Macias	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	961	
R1625	CTTCTCATCTCTTCGCTCCTCTT	CT-CTCCTCTCTCT	TTTCTCTTTTTCTTTCTT	-TTTT	955	
B450	<u>T</u> TCCGCGCCTTGCTGGCTGCCTGCTGCTCTTTT	<u>GC</u> T <u>GCT</u> TTTTT	<u>G</u> CTTTCTT	<u>G</u> TTTT	982	
AM11	<u>A</u> TGCTAGGTATCTCCCCACACACACACCCTCCCTC	<u>C</u> CTCTC <u>AC</u> TT	<u>C</u> TC	TTCTT	<u>T</u> C	862
Esmeraldo	CTCTACACACGTGGGGTGTGTGT	GCAACACGNCG-CAACACAA	NCTACAAA	ACTCGCAA	852	
Tc994	CTCTACACACGTGTG-TGTGTGT	GCAACACAACGACAACACAAA	ACTACAAA	ACTCGCAA	1071	

Palma2	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAGAGAAAAGAAAAA	1016
SC58	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1013
Choachi	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1018
H9	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1011
D3493	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1016
Macias	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1018
R1625	AT-CCCACACTTCTTTTT--CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1012
B450	AT <u>T</u> CCCACACTTCTTTTT <u>G</u> TTT <u>TG</u> CAACAGAAAAGAGGTGTAGGATAAAAAGAAAAGAAAAA	1042
AM11	<u>T</u> T---CCCACACTTCTTTTT <u>C</u> -AA <u>T</u> AGAAAAGAGGT--AGGA <u>CG</u> AAAAG--AGA <u>GGGG</u> AAG <u>C</u>	914
Esmeraldo	GAGATTAAAAAAGAATA--AAAAAGAAAAAAGTGGCGTGTGGNATGTGTGGTGTGTGGG	910
Tc994	GAGATTAAAAAAGAATA--AAAAAGAAAAAAGTGGCGTGTGGGATGTGTGGTGTGTGGG	1129

Palma2 GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1070
SC58 GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1067
Choachi GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1072
H9 GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1065
D3493 GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1070
Macias GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1072
R1625 GAAAGGGGGGGC---GGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1066
B450 GAAAGGGGGGGCGCGGGGGAGAGGATGTG--TGTGTGT-GATGCGGGAAAGAGAAAAAGAA 1099
AM11 GAAAGGGGTGGT---GGTGTGTGTGTG--TGTGGGAGATGCGTGCGTGTGTGGAGAA 968
Esmeraldo GCGGGG-CGGGGCATGCATATACACAACACCACACGCACACACACATGTGTAGTAGTA 969
Tc994 GCGGGGGCGGAGCATGCATATACACAACACCACACGCACACACACATGTGTAGTAGTA 1189

Palma2 AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1128
SC58 AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1125
Choachi AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1130
H9 AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1123
D3493 AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1128
Macias AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1130
R1625 AAAGGAAGAAAGAAA-GAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1124
B450 AAAGGAAGAAAGAAAAGAGGTGTGTGTGTGGTGT-GTGGTTGTTGTGGGTGGTTGAAGGA 1158
AM11 AAAGAGAGAGGAGAAGGGGGTTGGGGGGGAGGTTGTGTGTGTGGTTTTTTGGTGGTGGG 1028
Esmeraldo TATACAATGTAATATATATATATATATATATATGCATGTACATTATACAATATATATATA 1029
Tc994 TATACAATGTAATATATATATATATATATATA--TGCATGTACATTATACAATATATATATA 1247

Palma2 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTATAATCTCACAAGAGA 1186
SC58 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTA-AATCTCACAAGAGA 1182
Choachi AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTAAAAATCTCACAAGAGA 1188
H9 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTAAAAATCTCACAAGAGA 1181
D3493 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTAAAAATCTCACA-GAGA 1185
Macias AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAAACAACA-ACAACTAAAAATCTCACAAGAGA 1189
R1625 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACATACAAACGTAAATCTCACAAGAGA 1183
B450 AAAAAAAGAGGGAGAGAGCACACGTGCAA-CAACATACAAACGTAAATCTCACAAGAGA 1217
AM11 AGGAAAAAGAG--AGAGAGCACACGTGCAA-CAACA-ACAACTAAAAATCTCACAAGAGA 1084
Esmeraldo TGTATAATGTAC-A-----CGTGTGTGTATAATATATGTATGTGTGTGTGTATGTACGT 1081
Tc994 TGTATAATGTAC-AATGTACACGTGTGTGTATAATATATGTATGTGTGTGTGTATGTACGT 1306

Palma2 GACCACAGA---AGAAGATAAATACGTATATATGTATA---ATATATATATATGTTTTTTTTC 1240
SC58 GACCACGAA---ANA-----AATACGTATATATGTATA---ATATATATATGTTGG----- 1224
Choachi GACCACAAA---AAA-----AAATACGTATATATGTATA---AAATATATATGTTTTTTCTG 1238
H9 GACCACAAA---AAA-----AAATACGTATATATGTATATATATATATATATGTTTTTTTTC 1234
D3493 GACCACAAA---AAA-----AAATACGTATATATGTATA---ATATATATATGTTTTTTTTC 1235
Macias GACCACAAA---AAA-----AAATACGTATATATGTATA---ATATATATATGTTTTTTTTC 1239
R1625 GACCACAAA---GAAA---AAATACGTATATATGTATA---ATATATATATGTTTTTTTTC 1234
B450 GACCACAAA---AAA-----AAATACGTATATATGTATATATATATATATATGTTTTTTTTC 1270
AM11 GACTACAAA---AAA-----AA---AAAAATAT-TTTTTTTTTC 1116
Esmeraldo GCCTGTGTGTTTGTGTGTGTATGGTGTGTGTGTGTTGTATGCTGTGTGCGTGTCCACCA 1141
Tc994 GCATGTGTGTTTGTGTGTGTATGGTGTGTGTGTGTTGTATGCTGTGTGCGTGTCCACCA 1366

Palma2	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGCAGATACCCGCAA-----	1278
SC58	-----	1224
Choachi	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGGCAGGACTACCCGC-----	1277
H9	TTGTTTGTTTACAGACAC-TGAGTGTGGCAGGACTACCCGC-----	1274
D3493	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGGCAGGACTACC-----	1271
Macias	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGGCAGGACTACCCGC-----	1278
R1625	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGGCAGGACTACCCGC-----	1273
B450	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTGGCAGGACTACCCGC-----	1309
AM11	TTGTTTGTTTACAGAC-C-TGAGTGTG-CAGGACTACCCGC-----	1155
Esmeraldo	TCATATATATATA----CATATCCACGCTTATTTTTTTTTTCTTCTTCTTTTGTTTA	1195
Tc994	TCATATATATATATATACATACCCACGCTTATTTTTTTTTTCTTCTTCTTTTGTTTA	1426

TABELA III

Relação dos polimorfismos de mononucleotídeos (SNP's) e dos eventos de inserção e deleção detectados pela avaliação comparativa das seqüências das regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli*.

Cepas	SNP's	Inserções	Deleções
Palma 2	T/C – 29 e 62	G – 142, 783 e 778 C – 524 e 747 T - 665	443 510
	G/T – 31 e 696		
	T/A – 38 e 1172		
	C/T – 470		
	A/T – 497		
	G/C – 779		
SC58	G/C – 778	TA – 434/435	nd
	G/A – 1221		
Choachi	G/A – 145	TA – 729/730	nd
	G/C – 783		
	A/T – 1221		
H9	nd	TAT – 1213 a 1215	486
D3493	nd	C – 499	nd
Macias	nd	AT – 97/98	nd
		A – 1161	
R1625	G/T – 1167	C – 800 T – 1160	653 a 656
B450	A/T – 686, 691	A – 594, 1115	Após 86
	G/T – 690, 838, 865, 898, 907, 960, 970 e 996	G – 820, 978 T – 985, 1194	
	C/A – 763	TG – 1000 e 1001	
	A/C – 772	TAT – 1248 a 1250	
	G/C – 810, 825, 829, 832, 835, 854, 861, 885, 888, 894, 921, 963 e 1053	CGG – 1054 a 1056 TGCTG – 900 a 904 GCGGGG – 842 a 847	
	T/C – 837, 857, 864, 923 e 965	GCTGCATG – 911 a 918	
	C/T – 859, 895, 922, 961, 964	GGTTGGGTGCT – 872 a 882	

nd= não detectado

O alinhamento representado na Figura 10 serviu como base para a construção de filogramas através do software MEGA versão 2.1 (Kumar, Tamura e Nei, 1993) utilizando os métodos da Máxima Parsimônia (200 replicatas de bootstrap) e Neighbor-Joining (1.000 replicatas). Uma vez que os filogramas resultantes de ambos os métodos foram concordantes, são demonstrados no presente estudo somente o filograma resultante da análise por máxima parsimônia. A visualização das árvores confirmou o baixo polimorfismo das regiões ITS que flanqueiam a subunidade 5,8S do gene do rRNA entre as cepas de *T. rangeli* analisadas. A Figura 11 demonstra um filograma onde somente as seqüências das cepas de *T. rangeli* foram incluídas na análise, a qual não permitiu qualquer relação das cepas com suas origens geográficas e/ou hospedeiros.

Considerando a conservação da subunidade 5,8S do gene do rRNA, a baixa variabilidade de seqüência de ambas as unidades espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e a utilização de um organismo geneticamente relacionado (*C. fasciculata*) como “outgroup”, a análise por máxima parsimônia não foi suficientemente sensível para claramente separar todas as cepas estudadas (Figura 11).

Quando espécies distintas do gênero *Leishmania* e diferentes cepas de *T. cruzi* foram adicionadas à análise, um novo filograma foi elaborado (Figura 12) utilizando-se o mesmo método e padrões acima expostos. Nesta árvore pode-se observar uma visível separação das distintas espécies estudadas. Os três grupos formados estão representados na figura 12 e correspondem, respectivamente, as cepas de *T. rangeli* (grupo A), as cepas de *T. cruzi* (grupo B) e as cepas de *Leishmania* spp. (grupo C). A análise confirma a eficácia das regiões ITS e da subunidade 5,8S do gene do rRNA como marcadores de análise de variabilidade interespecífica.

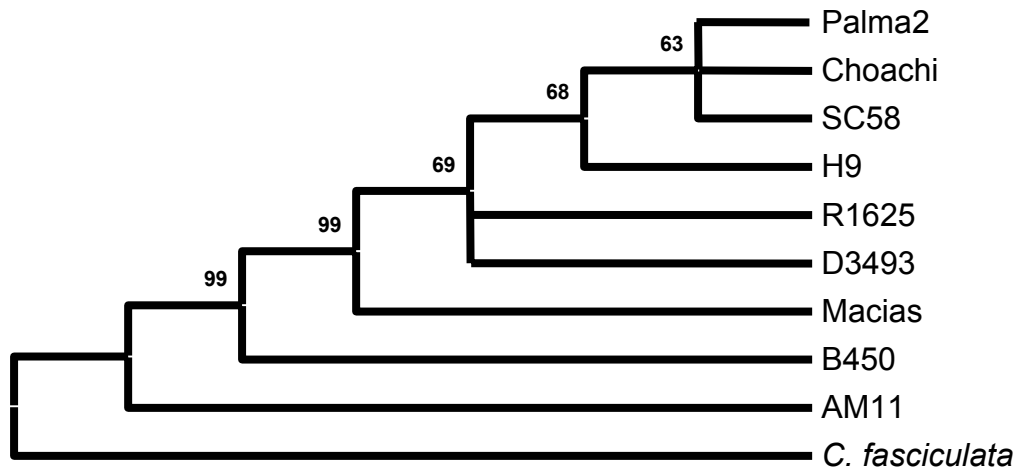


FIGURA 11: Filograma consenso resultante da análise das seqüências espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e hospedeiros por máxima parsimônia (200 bootstraps). As seqüências ITS e da subunidade 5,8S de *Crithidia fasciculata* (Y00055) foram incluídas como outgroup.

Ao contrário das cepas de *T. rangeli* cuja topologia das árvores demonstra baixo polimorfismo entre as mesmas (Figuras 11 e 12), não permitindo a correlação com hospedeiros e/ou regiões geográficas, as cepas de *T. cruzi* demonstraram evidente polimorfismo intraespecífico, tendo sido separadas em grupamentos relacionados aos ciclos silvestre e peri-doméstico (Z1 e Z3) ou doméstico (Z2) de transmissão do parasita.

As seqüências obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: AY230233 (cepa SC58), AY230234 (cepa Choachi), AY230235 (cepa D3493), AY230236 (cepa H9), AY230237 (cepa Macias), AY230238 (cepa Palma 2), AY230239 (cepa R1625) e AY230240 (cepa B450).

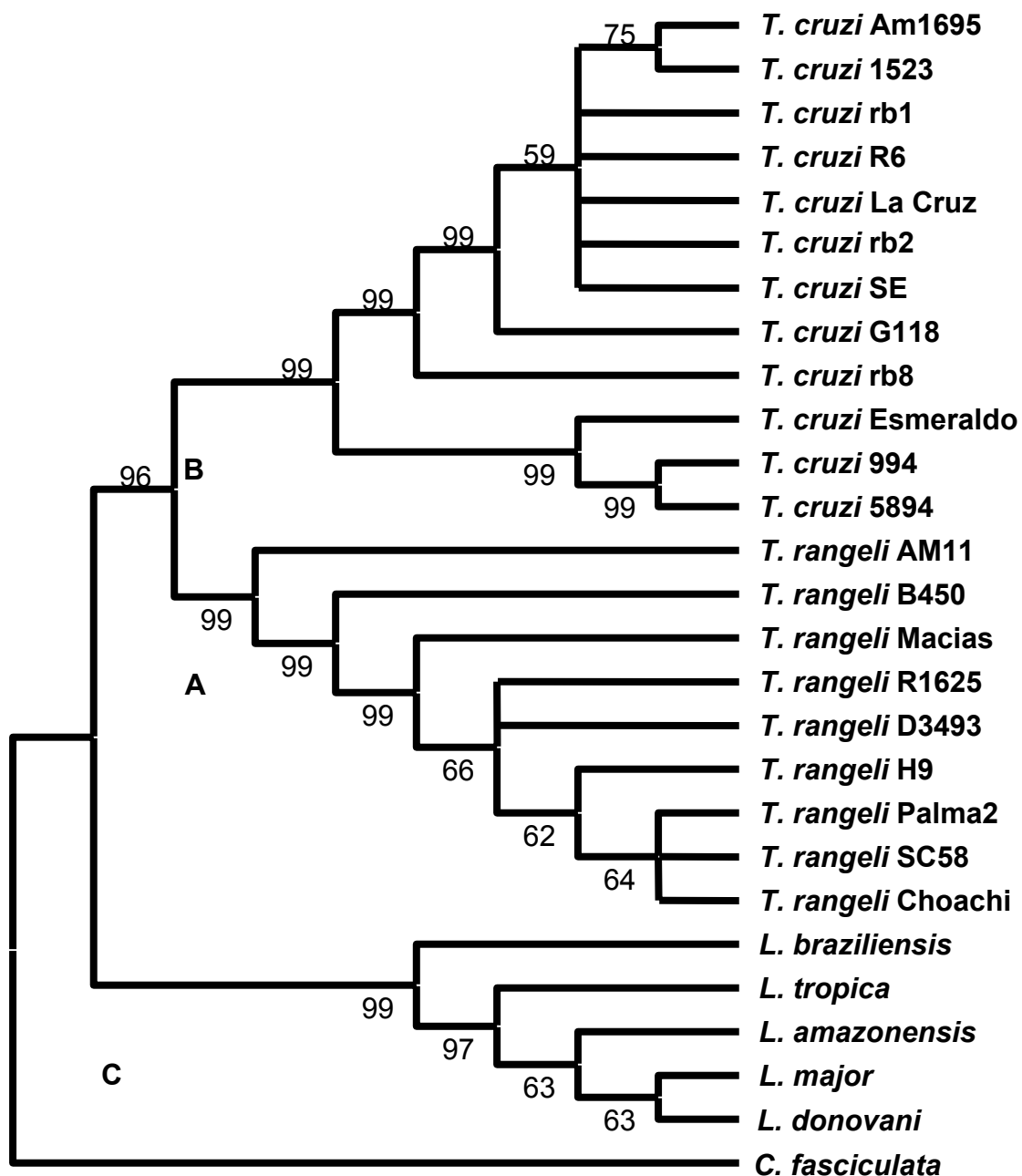


FIGURA 12: Filograma consenso resultante da análise das seqüências espaçadoras ITS-1 e ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA de cepas de *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. por máxima parsimônia (200 bootstraps). As seqüências ITS e da subunidade 5,8S de *Crithidia fasciculata* (Y00055) foram incluídas como outgroup.

5- DISCUSSÃO

A sobreposição na distribuição geográfica, o compartilhamento de hospedeiros vertebrados e invertebrados e a reatividade sorológica cruzada com o com *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas, demonstra a importância do estudo do *T. rangeli*, apesar de sua característica de apatogenicidade para seres humanos. A presença de infecções únicas ou mistas por estes parasitas em humanos, animais silvestres e triatomíneos é bastante comum, revestindo de suma importância a pesquisa, desenvolvimento e utilização de técnicas capazes de diferenciá-los ou analisar sua variabilidade (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1999; FERNANDES *et al.*, 1999; VALLEJO *et al.*, 2002).

Os relatos de infecções humanas pelo *T. rangeli* guardam estreita relação com a presença de triatomíneos do gênero *Rhodnius*, o principal vetor deste parasita (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992). Entretanto, mesmo considerando a alta afinidade entre espécies deste gênero e o *T. rangeli*, a ocorrência de um ciclo de desenvolvimento extra-intestinal do parasita, o qual é condição vital para a transmissão anterior do mesmo, é bastante inconsistente (VALLEJO *et al.*, 2002). Neste sentido, várias cepas de *T. rangeli* têm demonstrado comportamento variável quando infectando as diferentes espécies do gênero *Rhodnius*, revelando a variabilidade deste parasita e a estreita correlação parasita x hospedeiro (MACHADO *et al.*, 2001; VALLEJO *et al.*, 2002).

A elevada variabilidade intraespecífica observada em cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* já foi demonstrada por diferentes marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares, que apontaram inúmeros e importantes marcadores evolutivos e de diagnóstico, permitindo

inclusive uma caracterização detalhada de cepas, o que os torna especialmente recomendados para estudos epidemiológicos (ZINGALES *et al.*, 1999, HIDE, 1996).

De acordo com HIDE (1996), a distinção de espécies, assim como a caracterização de cepas dentro de uma dada espécie são fatores primordiais, uma vez que contribuem para determinar, por exemplo, a presença ou ausência de infecções ou ainda a caracterização do agente etiológico envolvido.

Um dos grandes trunfos dos estudos de genética de populações é permitir o entendimento e caracterizar a ampla variação genética dentro e entre as espécies, uma vez que esta variabilidade em diferentes populações pode refletir evidências de diferentes eventos evolucionários (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996).

Nesse sentido, a utilização de dados sobre o polimorfismo bioquímico de *T. cruzi* tem indicado que eventos de segregação e recombinação são aparentemente raros ou ausentes em populações naturais em função da reprodução clonal do parasita (VALLEJO *et al.*, 2002). Assim como para o *T. cruzi*, pouco se sabe sobre a existência ou não da reprodução sexuada em *T. rangeli* apesar dos inúmeros relatos de diferentes características biológicas, bioquímicas e moleculares de cepas isoladas de diferentes regiões geográficas (D'ALESSANDRO, 1976; MACEDO *et al.*, 1993; STEINDEL *et al.*, 1994; GRISARD *et al.*, 1999; VALLEJO *et al.*, 2002).

Apesar destas comprovações, estudos sobre a extensão desta variabilidade em *T. rangeli* e dos mecanismos responsáveis por estes eventos ainda permanecem pouco explorados e, portanto, a análise de polimorfismos de tamanho e de seqüências das regiões ITS pode fornecer informações relevantes para o entendimento da variabilidade genética do parasita.

Com a expressiva melhora das técnicas de PCR e seqüenciamento, a variabilidade de seqüências intraespecíficas, principalmente de genes nucleares em tandem, tem sido utilizada em estudos epidemiológicos de importantes doenças parasitárias (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996; AREZ *et al.*, 2000). Desta forma, a análise dos espaçadores internos (ITS) das seqüências do gene do rRNA são um dos melhores exemplos da ampla utilidade dos genes nucleares na comparação de seqüências dentro e entre populações (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996).

Segundo POWERS *et al.* (1997), entre os eucariotos, incluindo organismos como os diversos protozoários, plantas, vertebrados e fungos, os dados existentes a respeito dos espaçadores ITS tem sido utilizados na construção de árvores filogenéticas que permitem estimar a estrutura da genética das populações estudadas, avaliar o nível dos processos de evolução destas populações ou ainda determinar a identidade taxonômica dos organismos.

A amplificação por PCR oferece uma alternativa prática e vantajosa por ser um método altamente sensível e específico na caracterização e identificação de parasitas, assim como na análise da diversidade genética de uma determinada população (AREZ *et al.*, 2000). Entretanto os protocolos padrões de uma reação de PCR nem sempre são apropriados e, portanto, devem ser otimizados levando-se em conta a seqüência alvo a ser amplificada, os iniciadores, tampões e enzima, entre outros (INNIS *et al.*, 1999). Alguns autores consideram ainda que para a otimização de uma reação de PCR são necessárias certas doses de tentativa e erro, considerando esta etapa como parte integrante do processo (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996).

Apesar da proximidade filogenética dos parasitas, a utilização de iniciadores desenvolvidos primariamente para *T. cruzi* em nossos experimentos com o *T. rangeli*, apontou a necessidade de padronização da reação de PCR. Na sistemática molecular, a

maior atenção no processo de padronização de uma reação deve ser para com os pares de iniciadores, cuja seqüência determina a temperatura de ligação e, por conseqüência, a estringência da reação de PCR (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996). Desta forma, a padronização da PCR para a amplificação dos espaçadores ITS do gene do rRNA de cepas de *T. rangeli* foi realizada com o intuito de aumentar a estringência da reação sem diminuir a sensibilidade da mesma.

A amplificação da região alvo (ITS-1/subunidade 5,8S do gene do rRNA/ITS-2) foi observada em uma ampla faixa de concentração de MgCl₂ e KCl, incluindo a geração de produtos em pH distintos (Figura 5).

Nossos resultados demonstraram, após a determinação das concentrações ideais do tampão de reação e das condições térmicas de amplificação utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-2, a geração dos produtos de amplificação de 1,2Kb esperados (Figuras 5, 6 e 7) para todas as cepas constantes na Tabela I, com exceção da cepa SC61. Após inúmeras tentativas infrutíferas de amplificar a região ITS da cepa SC61, consideramos a existência de polimorfismos nos sítios de ligação dos iniciadores nas subunidades 28S e 18S do gene do rRNA, uma vez que outras hipóteses como baixa concentração de DNA molde ou contaminação foram descartadas. Entretanto, observando-se os resultados dos experimentos de gradiente de temperatura (Figura 7), observa-se a geração de bandas de 1,2Kb em temperaturas mais altas de ligação dos iniciadores, o que é contraditório com a existência de polimorfismos.

A despeito das concentrações e condições da reação de amplificação, bandas extras de tamanho inferior a 1,2Kb continuaram sendo observadas, mesmo após a utilização de condições de alta estringência em experimentos envolvendo gradiente de temperatura

(Figura 7). Estes resultados presuppõe a existência de cópias de ITS com tamanhos diferenciados dentro de um mesmo genoma.

A observação acima confirma dados anteriores que relatam a variabilidade dos espaçadores ITS em tripanosomatídeos, os quais podem variar tanto em tamanho como em seqüência dentro de uma mesma espécie possibilitando, desta forma, sua utilização como um marcador molecular na classificação de parasitas (ZAVALA-CASTRO *et al.*, 1992; PULIDO *et al.*, 1996). A presença de diferentes espaçadores ITS no genoma de um único indivíduo também foram relatados em nematodas dos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Belonolaimus* (POWERS *et al.*, 1997).

Experimentos utilizando iniciadores específicos para a amplificação dos espaçadores ITS-1 e ITS-2 separadamente, revelaram que esta variação no padrão de bandeamento se deve principalmente a diferenças no tamanho do espaçador ITS-2. Nestes experimentos a resolução dos produtos de amplificação em géis de agarose a 1% demonstrou a presença de bandas de aproximadamente 500pb para o espaçador ITS-1 e bandas variando de 300 a 800pb para o espaçador ITS-2 (dados não mostrados). Estes resultados confirmam dados anteriormente descritos para outras espécies do gênero *Trypanosoma* (FERNANDES *et al.*, 1999; DÁVILA, 2002) e *Leishmania* (DÁVILA & MOMEN, 2000) e indicam que a região correspondente ao ITS-1, a subunidade 5,8S e ao ITS-2 de *T. rangeli* pode apresentar tamanhos que variam de 700pb a cerca de 1,2 Kb.

A purificação, clonagem e seqüenciamento da banda de 1,2kb correspondente a região ITS-1, a subunidade 5,8S e ITS-2 de *T. rangeli* confirmou os tamanhos dos dois espaçadores revelados por eletroforese e demonstrou que o espaçador ITS-2 é maior do que o ITS-1. Esta variação no tamanho entre os espaçadores analisados e o maior comprimento do espaçador ITS-2, corrobora com estudos anteriores que descrevem o

mesmo fenômeno em outros tripanosomatídeos, incluindo-se o *T. cruzi* (FERNANDES *et al.*, 1999), *T. vivax* (DÁVILA, 2002) e *Leishmania* (DÁVILA & MOMEN, 2000). Entretanto, fenômeno contrário foi observado em parasitas metazoários do gênero *Trychostrongylus* sp. onde o espaçador ITS-2 possui cerca de 237-238pb e o espaçador ITS-1 cerca de 150pb a mais do que o ITS-2 em todas os exemplares analisados que incluem três espécies do gênero *Cylicocycclus* e *C. elegans* (HOSTE *et al.*, 1998).

O polimorfismo de tamanho dos espaçadores ITS do gene do rRNA parece indicar altos níveis de divergência genética, porém esta heterogeneidade pode ser considerada como um fator complicador para estudos de filogenia intra e interespecífica (POWERS *et al.*, 1997). A análise de ambos os espaçadores ITS-1 e ITS-2 das cepas incluídas no presente estudo, revelou um reduzido polimorfismo no tamanho dos produtos amplificados, indicando, conseqüentemente, um alto grau de conservação intraespecífica.

A análise das seqüências demonstrou ainda um baixo grau de polimorfismo entre as cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes hospedeiros e origens geográficas o que, segundo HERNÁNDEZ *et al.* (1993) também foi observado na seqüência dos genes do rRNA em diferentes cepas de *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos. Entretanto, outros estudos tem demonstrado níveis de variações intra-individuais e/ou intra-específicas substanciais em seqüências ITS-1 e ITS-2 para algumas espécies de artrópodos e platelmintos (HERWERDEN *et al.*, 2000). Em *Ascaris* sp. tal variabilidade intraespecífica também foi detectada em 13 amostras isoladas de porcos e humanos de diferentes regiões geográficas (XINGQUAN *et al.*, 1999).

A utilização de seqüências de DNA visando a análise de parâmetros evolutivos de genes, têm revelado um volume considerável de informações sobre a origem de novos

locus, evolução de famílias de genes, a convergência em nível molecular devido a seleção e sobre os processos de mutação substitucional (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996).

A presença de sítios polimórficos derivados de mutações substitucionais nas regiões do gene do rRNA analisadas pode estar revelando indicações de processos evolutivos de *T. rangeli*, principalmente quando este(s) evento(s) ocorrem na seqüência da subunidade 5,8S deste gene, a qual teoricamente deveria ser conservada entre cepas ou ainda entre espécies filogeneticamente próximas. Entretanto, HILLIS & DIXON (1991) comentam como esperada a presença de regiões com alto grau de similaridade entre diferentes táxons, assim como regiões com baixa similaridade na seqüência das subunidades do gene do rRNA.

No presente trabalho, foram observados sítios polimórficos principalmente na região ITS-2 de algumas das cepas de *T. rangeli* analisadas (Figura 10). Polimorfismos nesta região espaçadora já haviam sido relatados em mosquitos do gênero *Anopheles* por MANONMANI et al. (2001) que, entretanto, também demonstraram que o espaçador ITS-2 apresenta muito menos variação intraespecífica do que interespecífica, o que está de acordo com nossos resultados. Outros estudos apontam uma considerável variação na seqüência do espaçador ITS-2 em seis espécies do complexo *Anopheles maculata* (PROFT et al., 1999) e em diferentes espécies da Família Phlebotominae, confirmando o potencial informativo deste espaçador a nível intraespecífico (DEPAQUIT et al., 2002).

Contrariando os resultados acima citados, diferentes estudos desenvolvidos com espécies dos gêneros *Ascaris* e *Schistosoma* (XINGQUAN et al., 1999; DÉSPRES et al., 1995) e com diferentes espécies de triatomíneos (BARGUES et al., 2000) revelaram um alta conservação do espaçador ITS-2 ou mesmo uma maior conservação deste em relação ao ITS-1, respectivamente.

Baseados na ausência de diferença na seqüência de ITS-2 de *Ascaris lumbricoides* e *A. suum*, XINGQUAN et al. (1999) comentam que as duas espécies podem, na verdade, constituir uma única. Entretanto, ressaltam que somente o resultado desta análise não é suficiente para suportar a hipótese levantada, uma vez que os dois táxons possuem diferenças suficientes em outras seqüências gênicas, na sua biologia reprodutiva e especificidade por hospedeiro. Concordamos com a observação destes autores, ressaltando a importância da observação de caracteres biológicos, bioquímicos e comportamentais, além dos marcadores moleculares na avaliação de variabilidade inter e intraespecífica.

Ressalta-se que, apesar da presença de sítios polimórficos de tamanho e motivos variados na seqüência dos espaçadores ITS-1 e ITS-2 das diferentes cepas de *T. rangeli*, a análise das seqüências (Figuras 10, 11 e 12) revelou uma baixa variabilidade intraespecífica quando comparado com as importantes diferenças observadas nas seqüências de espécies distintas. Resultados similares foram observados quando foram estudados os espaçadores ITS de *Trichostrongylus vitrinus* (HOSTE et al., 1998).

A presença de grandes blocos de seqüências repetitivas e conservadas nas regiões ITS das cepas de *T. rangeli* estudadas também foi anteriormente reportado em 7 espécies distintas de mosquitos do gênero *Aedes*. Segundo HLINKA, MURRELL & BARKER (2002) a presença destes blocos são um evento comum nas subunidades 18S, 5,8S ou 28S do gene do rRNA tanto entre indivíduos de uma mesma espécie quanto entre espécies filogeneticamente próximas. Entretanto, a ocorrência destes blocos conservados em espaçadores do tipo ITS torna estas regiões possíveis alvos de estudo, uma vez que estes espaçadores apresentam, em geral, variabilidade intra e interespecífica (HLINKA, MURRELL & BARKER, 2002). Para estes autores, os blocos de seqüências conservadas contidas nos

espaçadores ITS-1 e ITS-2 são importantes na manutenção da estrutura secundária do pré-rRNA (HLINKA, MURRELL & BARKER, 2002).

O espaçador ITS-1, juntamente com o ITS-2 e o espaçador externo (EST) são transcritos em uma molécula precursora denominada 45S que posteriormente é clivada em sítios específicos e tem os espaçadores removidos. A função precisa dos ITS não são conhecidas, entretanto existe uma boa evidência que possuam importante papel na biogênese da subunidade maior do rRNA e maturação da subunidade menor. A deleção de nucleotídeos da seqüência do espaçador ITS-2 de *Sacharomyces cerevisiae* confirmou esta hipótese uma vez que a síntese das subunidades do ribossomo foi diminuída ou abolida, especialmente quando a deleção alterava a estrutura secundária do ITS-2 (HLINKA, MURRELL & BARKER, 2002).

Repetições nucleotídicas com seqüência e tamanho variáveis reveladas após o alinhamento das cepas de *T. rangeli*, além de eventos de inserção/deleção caracterizados pela presença ou ausência de nucleotídeos entre as cepas, tem sido relatadas em organismos filogeneticamente relacionados a *T. rangeli* tais como *Leishmania* spp. (FERNANDES et al., 1994), *Endothrypanum* sp. (FERNANDES, DEGRAVE & CAMPBELL, 1993), *Trypanoplasma* sp. (MASLOV et al., 1993), *Phytomonas* sp. (STURM et al., 1995), *T. cruzi* (FERNANDES et al., 1998) e *T. simiae* (STURM et al., 1998). Estas repetições, também chamadas de microsátélites, já foram descritas em um grande número de organismos, constituindo-se em uma poderosa ferramenta através da qual é possível caracterizar especificamente cepas de parasitas ou mesmo realizar estudos de genética de populações (SCHONIAN et al., 1996; MACLEOD, TURNER & TAIT, 1997; OLIVEIRA et al., 1998). A presença destes microsátélites pode ser devida a eventos de replicação, que

também seriam responsáveis pelo aumento e/ou diminuição no tamanho dos espaçadores ITS (HLINKA, MURRELL & BARKER, 2002).

A baixa variabilidade intraespecífica observada entre cepas de *T. rangeli* no presente estudo (Figura 10) e representada pelos filogramas dispostos nas Figuras 11 e 12, não permitiu a separação das cepas estudadas em grupos relacionados à origem geográfica ou hospedeiros.

Trabalhos anteriores baseados na análise de variabilidade do DNA (Macedo *et al.*, 1993), na determinação da seqüência da região hipervariável do espaçador intergênico do gene do mini-exon (GRISARD *et al.*, 1999) e na análise do DNA cinetoplástico (kDNA) (VALLEJO *et al.* 2002) indicaram que as cepas de *T. rangeli* podem ser divididas em, no mínimo, dois grupos distintos, um compreendendo as cepas da América Central e Norte da América do Sul e outro incluindo os parasitas do Sul do Brasil (VARGAS *et al.*, 2000). No presente estudo, a utilização dos espaçadores ITS-1, ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA como marcadores não foi suficientemente sensível para detectar estes agrupamentos. Estas diferenças são, provavelmente, devidas a conhecida adaptação do parasita ao vetor local e não ao seu isolamento geográfico propriamente dito (MACHADO *et al.*, 2001; VALLEJO *et al.*, 2002).

Ao compararmos as diferentes cepas de *T. rangeli* com cepas de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (Figura 12), observamos que a análise do conjunto formado pelos espaçadores ITS-1, ITS-2 e pela subunidade 5,8S do gene do rRNA resulta em um filograma cuja topologia não deixa dúvidas sobre a capacidade de detecção de variabilidade e caracterização interespecífica destes marcadores. Nota-se ainda que a baixa similaridade do ITS-1 e ITS-2 entre as diferentes espécies de tripanosomatídeos dificultou a obtenção de

alinhamentos múltiplos consistentes, contribuindo assim à formação de clades bem diferenciados.

Topologia semelhante foi observada no agrupamento das diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrada por FERNANDES *et al.* (1999), onde a análise dos espaçadores ITS permitiu a divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens distintas, que revelaram um baixo nível de similaridade entre elas. Estas duas linhagens denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, correspondendo aos zimodemas 1 e 2 propostos por MILES *et al.* (1980), respectivamente. Estes resultados foram corroborados por análises de outras famílias de multigenes, como por exemplo do mini-exon ou spliced-leader (GRISARD, 1999; FERNANDES *et al.*, 2001).

Concluindo, as regiões ITS-1, ITS-2 e a subunidade 5,8S do gene do rRNA em conjunto não se apresentam como um bom marcador na análise da variabilidade intraespecífica das cepas de *T. rangeli* estudadas. Deve-se ressaltar, entretanto que, o estudo de um maior número de amostras, compreendendo inclusive amostras de outras regiões, pode conseqüentemente, mudar este conceito.

Apesar desta observação, nossos resultados confirmam pesquisas anteriores quanto a eficácia desta região na análise e diferenciação interespecífica (FRITZ, 1998), o que está de acordo com trabalhos envolvendo a análise por RFLP da mesma região do rDNA de diferentes espécies de *Trichostrongylus* (HOSTE *et al.*, 1998). Além disso, os trabalhos com este marcador demonstraram sua versatilidade, especificidade e facilidade na execução dos experimentos que os utilizam, o que tem contribuído para o crescimento dos bancos de dados de seqüências dos espaçadores ITS assim como das subunidades do gene do rRNA.

6 - CONCLUSÕES

- O tampão contendo 100mM Tris-HCL pH 9,2, 15mM MgCl₂ e 250mM KCl mostrou-se ideal para a amplificação das regiões ITS (ITS-1/subunidade 5,8S do gene do rRNA/ITS-2) das diferentes cepas de *T. rangeli*.
- A condição ideal para a amplificação via PCR das regiões ITS das diferentes cepas de *T. rangeli* foi : 94°C – 4 minutos, seguidos de 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, temperatura de ligação dos iniciadores de 60°C por 1 minuto e temperatura de extensão da fita de DNA de 72°C por 1 minuto, concluindo-se a ciclagem com temperatura de extensão final de 72°C.
- As bandas resultantes da amplificação das regiões ITS utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-2 apresentaram um tamanho de cerca de 1,2kb.
- Bandas extras com tamanho inferior a 1,2Kb presentes nos mais distintos padrões de amplificação, mesmo em condições de alta estringência, demonstram a presença de tamanhos de ITS diferenciados dentro de um mesmo genoma.
- Não foi possível obter produtos de 1,2Kb de boa qualidade via amplificação das regiões ITS da cepa SC61, independente da temperatura de ligação dos iniciadores, do tampão utilizado ou mesmo da adição de DMSO ou BSA.

- Devido ao pouco material amplificado ou a dificuldade de obtenção de seqüências de boa qualidade não foi possível obter seqüências da região ITS das cepas SC61, H8GS, H14 e San Agustin de *T. rangeli*.
- As seqüências da região ITS-1 das cepas de *T. rangeli* analisadas apresentaram um tamanho variando entre 405 e 417pb, a região codificante da subunidade 5,8S do gene do rRNA variou de 173 a 175pb e a região de ITS-2 de 614 a 675pb.
- As seqüências das cepas de *T. rangeli* oriundas de diversos hospedeiros e regiões geográficas mostraram-se bastante conservadas em relação ao tamanho da região ITS-1/5,8S/ITS-2 do gene do rRNA.
- O alinhamento das seqüências revelou um conteúdo médio de G/C de 41,6% entre as cepas de *T. rangeli* analisadas.
- A análise exclusiva das seqüências do gene da subunidade 5,8S do rRNA mostrou uma alta conservação entre as cepas de *T. rangeli* e mesmo entre estas e as diferentes espécies analisadas.
- Polimorfismos de mononucleotídeos (*single nucleotide polymorphisms* - SNP's), devidos a alterações e/ou inserções de bases, assim diversas repetições nucleotídicas de motivos e comprimentos variáveis, foram observados na seqüência da subunidade 5,8S, assim como nos espaçadores ITS-1 e ITS-2 do gene do rRNA das cepas de *T. rangeli* analisadas.

- Considerando a conservação da subunidade 5,8S do gene do rRNA, a baixa variabilidade de seqüência de ambas as unidades espaçadoras ITS-1 e ITS-2, a análise por máxima parsimônia das seqüências obtidas não foi suficientemente sensível para claramente separar todas as cepas estudadas.
- A adição de espécies do gênero *Leishmania* e diferentes cepas de *T. cruzi* à análise por máxima parsimônia e Neighbor-Joining permitiu a formação de três grupos que correspondem, respectivamente, as cepas de *T. rangeli*, as cepas de *T. cruzi* e as cepas de *Leishmania* spp.
- A análise das regiões ITS-1, ITS-2 e da subunidade 5,8S do gene do rRNA em conjunto não se apresenta como um bom marcador na análise da variabilidade intraespecífica das cepas de *T. rangeli* estudadas, entretanto, se mostra eficiente na análise e diferenciação interespecífica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, L.; ROMANHA, A.J.; COSENZA, H.; KRETTLI, A.U. - Trypanosomatid isolates from Honduras: Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44** (6): 676 – 683, 1991.
- AFCHAIN, D.; LeRAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. - Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J. Parasitol.**, **65**: 507-514, 1979.
- ANDREWS, R.H. & CHILTON, N.B. - Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. **Int. J. Parasitol.**, **29**: 213 – 253, 1999.
- AREZ, A.P; LOPES, D.; PINTO, J.; FRANCO, A.S.; SNOUNOU, G.; ROSÁRIO, V.E. – *Plasmodium* sp.: Optimal Protocols for PCR Detection of Low Parasite Numbers from Mosquito (*Anopheles* sp.) Samples. **Exp. Parasitol.**, **94**: 269-272, 2000.
- BARGUES, M.D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J.M.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J.; MAS-COMA, S. - Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **95**(4): 567 – 573, 2000.
- BARRETO, G.; VAGO, A.R.; GINTHER, C.; SIMPSON, A.J.G.; PENA, S.D.J. - Mitochondrial D-Loop “signatures” produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. **Am. J. Hum. Genet.**, **58**: 609 – 616, 1996.

- BARRET, T.V. & OLIVEIRA, T.S. - A trypanosome indistinguishable from *Trypanosoma rangeli*, in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **75**(5): 445 – 446, 1977.
- BELKUM, A. - Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetics variants of human papillomavirus type 16. **J. Vir. Methods**, **55**: 435 – 443, 1995.
- BENAVIDES, G.R.; SULLIVAN, J.J., STEURER, F.; MCGRAW, R.A.; TARLETON, R. L. - Differentiation of trypanosomatid species by hybridization to selected rRNA probes. **Mol. Cell. Probes**, **7**(2):89-96. 1993.
- BITTENCOURT, A.L. – Transmissão Vertical da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^a ed., Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000, p. 16 – 19.
- BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W.C. - Polymorphism in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. **Acta Tropica**, **61**: 31 – 40, 1996.
- BRENER, Z. - Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **18**: 145 – 146, 1977.
- BRENER, Z. - The Pathogenesis of Chagas Disease: An overview of current theories. In: PAHO/WHO Scientific Publications. Chagas' Disease and the nervous system. 547. Washington, D. C.; 1994, p. 30 – 46.
- BRENER, Z. - *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E.; Rassi, A. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92, 1992, p. 31-47.

- BRENER, Z. & CHIARI, E. - Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **5**: 220 – 224, 1963.
- BRENIÉRE, S.F.; BOSSENO, M.F.; BARNABE, C.; URDANETA-MORALES, S.; TIBAYRENC, M. - Population genetics of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: taxonomical and epidemiological purpose. **Biol. Res.**, **26** (1 – 2): 27 – 33, 1993.
- BRINGAUD, F.; VEDRENNE, C.; CULILLIER, A.; PARZY, D.; BALTZ, D.; TETAUD, E.; PAYS, E.; VENEGAS, J.; MERLIN, G.; BALTZ, T. - Conserved organization of genes in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **94**: 249 – 264, 1998.
- BRIONES, M.R.S., SOUTO, R.P., STOLF, B.S.; ZINGALES, B. - The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **104**: 219 – 232, 1999.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. - Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **111**: 95 – 105, 2000.
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. - Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozoology**, **14**: 447 – 451, 1967.
- CASTRO, C.; HERNANDEZ, R.; CASTAÑEDA, M. - *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **2**(3-4): 219-233, 1981.
- CHAGAS, C. - Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159 – 218, 1909.

- COLEMAN, A.W. & MAI, J. C.M. - Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. **J. Mol. Evol.**, **45** (2): 168 – 177, 1997.
- COURA, J.R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRET, T. V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. - Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Barasilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **90**: 278-279, 1996.
- CUBA CUBA, C.; MORALES, N.; FERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, W. - Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 infectado naturalmente por trypanosomas semejantes a *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en caserios del distrito de Cascas, Contumazá, Depto. de Cajamarca, Peru. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **14**: 191 – 202, 1972.
- CUBA CUBA, C. - Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31** (2): 207 –220, 1998.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr. G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. - Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **73**: 145 – 155, 1995.
- CUPOLILLO, E.; PEREIRA, L.O.; FERNANDES, O.; CATANHO, M.P.; PEREIRA, J. C.; MEDINA-ACOSTA, E.; GRIMALDI, G. Jr. - Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **93** (5): 677 – 683, 1998.
- D' ALESSANDRO, A. - Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R. and EVANS, D. A. Biology of Kinetoplastida. Vol. 1. London. Academic Press; 1976; p. 328 – 403.
- D' ALESSANDRO, A.; EBERHARD, M.; de HINCAPIE, O.; HALSTEAD, S. - *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri sciureus* from Bolivia and in *Saguinus mistax* from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**(2): 285 – 289, 1986.

- D' ALESSANDRO, A. & SARAIVA, N.G. - *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J. P. & BAKER, J. P. Parasitic Protozoa, 2nd ed. London; Academic Press; 1992, p. 1 – 54.
- D' ALESSANDRO, A. & SARAIVA, N.G. - *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES HERBERT, M. Protozoal Disease V. II. Oxford University Press; 1999; p. 398-412.
- DÁVILA, A.M.R. - Tripanosomose animal na América do Sul: Epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. Rio de Janeiro, 2002 (Tese de Pós-Doutorado - Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz).
- DÁVILA, A.M. & MOMEN, H. - Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **94**: 651-654, 2000.
- DEANE, L. M. - Encontro de tripanossomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*, no Estado do Pará. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, **10**: 451 – 458, 1958a.
- DEANE, L.M. - Novo hospedeiro de tripanossomos do tipo cruzi e rangeli encontrados no Estado do Pará: o marsupial *Metachirops opossum opossum*. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, **10**: 531 – 541, 1958b.
- DE LEON, J.R.- El *Trypanosoma rangeli* observado en seres humanos en Guatemala. Publicaciones del Instituto de Investigaciones Cientificas, Universidad de San Carlos de Guatemala, nº 3, 32p, 1949.
- DE LEON, J.R.- Trypanosomiasis humana por el *Trypanosoma rangeli* en Guatemala. Publicaciones de Instituto de Pesquisa de la Universidad de San Carlos de Guatemala, nº 8, 12p, 1952.
- DEPAQUIT, J.; FERTÉ, H.; LÉGER, N.; LEFRANC, F.; ALVES-PIRES, C.; MAROLI, M.; MORILLAS-MARQUEZ, F. RIOUX, J.A.; SVOBODOVA, M.; VOLF, P. – ITS2

sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*.

Int. J. Parasitol., **32**: 1123-1131, 2002.

DESQUESNES, M.; McLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DÁVILA, A.M. - Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **Int. J. Parasitol.**, **31**: 610-614, 2001.

DÉSPRES, L.; KRUGER, F.J.; IMBERT-ESTABLET, D.; ADAMSOM, M.L. - ITS-2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. **Int. J. Parasitol.**, **25**: 1509-1514, 1995.

DIAS, J.C.P. - Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. & BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^a ed., Rio de Janeiro, RJ; Guanabara Koogan, 2000; p. 48 - 68.

DIOTAIUTI, L.; SILVEIRA, A.C.; ELIAS, M.; STEINDEL, M. - The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87(3)**: 451, 1992.

DVORAK, J.A.; HARTMAN, D.L.; MILES, M.A. - *Trypanosoma cruzi*: Correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. **J. Parasitol.**, **27**: 472-474, 1980.

DYE, C.; DAVIS, C.R.; LINES, J.D. - When are parasites clonal? **Nature**, **348**: 120, 1990.

ELBADRI, G.A.; DE LEY, P.; WAEYENBERGE, L.; VIERSTRAETE, A.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J. - Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal

- transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. **Int. J. Parasitol.**, **32**(2): 199-205, 2002.
- FERNANDES, O.; MURTHY, V.K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W.M.; CAMPBELL, D.A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **66**: 261-271, 1994.
- FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. **Parasitology**, **107**: 219-224, 1993.
- FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.V.; NAIFF, R.D.; BARRET, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using the mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58**: 807-811, 1998.
- FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; JANSEN, A.M.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B.; COURA, JR. - Populational heterogeneity of brazilian *Trypanosoma cruzi* Isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 195 – 197, 1999.
- FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B., DERRE, R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C.; STURM, N.R.; NAIFF, R.D.; BARRER, T.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. – A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **95**: 97-99, 2001.
- FRITZ, G.N. - Sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer 2 of five species of South American human malaria mosquitoes. **DNA Seq.**, **8** (4): 215 – 221, 1998.

- GASSER, R.B.; MONTI, J.R.; ZHU, X.; CHILTON, N.B.; HUNG, G.C.; GULDEBERG, P. - Polymerase chain reaction-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA to fingerprint parasites. **Electrophoresis**, **18** (9): 1564 – 1566, 1997..
- GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; SARAIVA, N.; SEGURA, I. & MOREL, C. M. - Schizodeme analysis with the restriction endonuclease RSA I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86** (4): 477 – 478, 1991.
- GONZALES, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M. E.; NOGUEIRA, N. & LIZARDI, P. M. - Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: it's use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**: 3356 – 3360, 1984.
- GREIG, S. & ASHALL, F. - Detection of South American trypanosomes in insects using total parasite DNA probes. **P. Today**, **3**: 375 – 376, 1987.
- GRISARD, E.C. & STEINDEL, M. - *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10^a ed. Editora Atheneu; 2000; p. 97-100.
- GRISARD, E.C. - Estudo da variabilidade do gene do mini-exon e produção de cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. Minas Gerais, 1999a, 206p (Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- GRISARD, E.C.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. - Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, **118**: 375-382, 1999b.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; GUARNIERI, A.A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. - Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in

Central and South America: overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(2): 203-209, 1999.

GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C.J.; JARAMILLO, C.A.; BRIDGE, D. - Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. **Parasitology**, **94**: 475 – 484, 1987.

GULL, K. - The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **Int. J. Parasitol.**, **31**(5 – 6): 443 – 452, 2001.

GUEVARA, P.; ALONSO, G.,; DA SILVEIRA, J.F.; DE MELLO, M.; SCORZA, J.V.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J.L. - Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **56**(1):15-26, 1992.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. - Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Res.**, **76**: 311 – 318, 1990.

HERNANDEZ, R. & CASTAÑEDA, M. - An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**,**8**(4): 305-315, 1983.

HERNANDEZ, R., MARTINEZ-CALVILLO, S., HERNANDEZ-RIVAS, R., GOMEZ, E. - *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. **Biol. Res.** **26**: 109-114, 1993.

HERWERDEN, L.V.; BENZIE, J.; PELOW, L.; DAVIES, C. - Microsatellite markers for coral trout (*Plectropomus laevis*) and red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) and their utility in other species of reef fish. **Mol. Ecol.**, **9**(11): 1929-1931, 2000.

HIDE, G. The molecular identification of trypanosomes. **Met. Mol. Biol.**, **50**: 243-62, 1996.

HILLIS, D.M. & DIXON, M.T. – Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quart. Rev. Biol.**, **66**: 411-453, 1991.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. Molecular Systematics. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, USA; Sinauer Associates, 1996, 655p.

HLINKA, O., MURRELL, A.; BARKER, S.C. – Evolution of secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda). **Heredity**, **88**: 275 – 279, 2002.

HOARE, C. - The Trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Oxford; Blackwell Scientific Publications; 1972. p. 288 – 314.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEM. M.; van KNAPEN, F. - Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitol. Res.**, **83** (3): 285 – 289, 1997.

HOSTE, H., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I.; GASSER, R.B.A. - Comparison of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA in seven species of *Trichostrongylus* (*Nematoda: Trichostrongylidae*). **Int. J. Parasitol.**, **28**: 1251 – 1260, 1998.

HUDSON, L.; GUHL, F.; de SANCHEZ, N.; BRIDGE, D.; JARAMILLO, C. A. & YOUNG, A. - Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, **96**: 449 – 460, 1988.

HURST, G.D.; HURST, L. D. & MAJERUS, M. E. - Evolutionary genetics. Selfish genes move sideways. **Nature**, **23**: 356 (6371): 659 – 660, 1992.

INNIS, M.; GELFAND, D.H.; SMINK, J.J. – PCR – Applications/Protocols for functional genomics. New York; Academic Press; 1999.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. - MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.02. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University, University Park; 1993.

- LOSOS, G.J. – Infections tropical diseases of domestic animals. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical; 1986.
- LUCENA, D.T. & VERGETTI, J.G. - Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do estado de Alagoas. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **15**(4): 171-178, 1973.
- MACEDO, A.M.; VALLEJO, G.A.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. - DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: new tool for characterization of strains and clones. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **55**: 147 – 154, 1993.
- MACEDO, A.M.; VALLEJO, G.A.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. – DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. In: PENA, S.D.J., CHAKRABORTY, R., EPPLIN, J.T., JEFFREYS, A.J. DNA Fingerprinting: State of the Science, Basel/Switzerland; Birhauser Verlag; 1993b; p. 321-329.
- MACEDO, A.M. & PENA, S.D.J. - Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **P. Today**, **14**(3): 119 – 124, 1998.
- MACHADO, P.E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G.; KOERICH, L.B.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. - Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int. J. Parasitol.**, **31**: 631-633, 2001.
- MACINA, R.A.; ARAUJO, S.; REYES, M.B.; SANCHEZ, D.O.; BASOMBRIÓ, M.A.; MONTAMAT, E.E.; SOLARI, A.; FRASCH, A.C.C. - *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **25**: 45 – 53, 1987.

- MANONMANI, A.; TOWSON, H. ADENIRAN, T.; JAMBULINGAM, P.; SAHU, S.; VIJAYAKUMAR, T. – rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. **Acta Tropica**, **78**: 3-9, 2001.
- MASAKE, R.A.; MAJIWA, P.O.; MOLOO, S.K.; MAKAU, J.M.; NJUGUNA, J.T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O.K.; NANTULYA, V.M. - Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polimerase chain reaction. **Exp. Parasitol.**, **85**: 193-205, 1997.
- MASIGA, D.K.; SMYTH, A.J.; HAYES, P.; BROMIDGE, T.J.; GIBSON, W.C. – Sensitive detection os trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. **Int. J. Parasitol.**, **22**: 909-918, 1992.
- MASIGA, D.K.; McNAMARA, J.J.; GIBSON, W.C. - A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. **Vet. Parasitol.**, **62**(1-2): 27-33, 1996.
- MASLOV, D.A.; ELGORT, M.G.; WONG, S.; PECKOVA, H.; LOM, J.; SIMPSON, L.; CAMPBELL, D.A. - Organization of mini-exon and 5S rRNA genes in the kinetoplastid *Trypanoplasma borreli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **61**(1): 127-35, 1993.
- McLAUGHLIN, G.L.; SSENYONGA, S.S.; NANTEZA, E.; RUBAIRE-AKIKI, WAFULA, O.; HANSEN, R.D.; VODKIN, M.H.; NOVAK, R.J.; GORDON, V.R.; MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M.; AVILES, H.; ARMIJOS, R.; SANTRICH, C.; WEIGLE, K.; SARAVIA, N.; WOZNIAK, E.; GAYE, O.; MDACHI, R.; SHAPIRO, S.Z.; CHANG, K.P.; KAKOMA, I. – PCR-based detection and typing of parasites. In: AZCEL, M.A.; ALKAN, M.Z. Parasitology for the 21st Century. Chapter 25. CAB International. Wallingford Oxon; 1996; p. 261-287.
- MacLEOD, A.; TURNER, C.M.; TAIT, A. - Detection of single copy gene sequences from single trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **84**(2): 267-70, 1997.

- McNAMARA, J.J.; LAVEISSIERE, C.; MASIGA, D.K. - Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Cote d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. **Acta Tropica**, **59**(2): 85-92, 1995.
- MICHELS, P.A. & HANNAERT, V. - The evolution of kinetoplastid glycosomes. **J. Bioenerg. Biomembr.**, **26**(2): 213-219, 1994.
- MILES, M.A., LANHAM, S.M., DE SOUZA, A., POVOA, M. - Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evolution for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **74**: 221 – 237, 1980.
- MILES, M.A.; ARIAS, J.R.; VALENTE, S.A.S.; NAIF, R.D.; de SOUZA, A.A.; POVOA, M.M.; LIMA, J.A.N.; CEDILLOS, R.A. - Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32** (6): 1251 – 1259, 1983.
- MORLAIS, I.; GREBAUT, P.; BODO, J.M.; DJOHA, S.; CUNY, G. - Characterization of trypanosome infections by polymerase chain reaction (PCR) amplification in wild tsetse flies in Cameroon. **Parasitology**, **116**: 547-554, 1998.
- MULLIS, K.B. & FALOONA, F.A. - Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzimol.**, **155**: 335 – 350, 1987.
- MURTHY, V.K.; DIBBERN, K.M.; CAMPBELL, D.A. - PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Cell Probes**, **6**: 237-243, 1992.
- OLIVEIRA, R.P; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D.J. – Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 3776-3780, 1998.

- PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, **20**: 191 – 208, 1953.
- PROFT, J.; MAIER, W.A.; KAMPEM, H. – Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polimerase chain reaction assay. **Parasitol. Res.**, **85**: 837-843, 1999.
- PROGRAMA BLAST. [on line] Disponível na Internet via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- PROGRAMA GELASSEMBLE DO PACOTE GCG WISCONSIN. [on line] Disponível na Internet via <http://www.accelrys.com>
- PROGRAMA PHRED/PHRAP CONSED. [on line] Disponível na Internet via <http://www.phrap.org>
- PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. – *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica** **62**: 163-170, 1996.
- RAMÍREZ, J. L. & GUEVARA, P. - The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **66**: 261:277, 1987.
- RAMIREZ, L.E.; MACHADO, M.I.; MAYWALD, P.G.; MATOS, A.; CHIARI, E.; SILVA, E.L. - Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no Sudoeste do Brasil, região endêmica para a doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**: 99-102, 1998.
- RAMOS, A.; MASLOV, D.A.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.A.; SIMPSON, L. - Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. **Exp. Parasitology**, **82** : 242-250, 1996.

- REQUENA, J. M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; SOTO, M.; LOPEZ, M. C.; ALONSO, C. - Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: It's potential use in diagnosis and strain classification. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **51**: 271 – 280, 1992.
- ROSS, A. & NOVOA-MONTERO, D. - Comparability and reability of ELISA, immunofluorescence and indirect hemmaglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **J. Infec. Diseases**, **168**: 1581 – 1584, 1993.
- SAIKI, R.F.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARHEIM, N. - Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**: 1350 – 1354, 1985.
- SALDAÑA, A. & SOUSA, O.E. - *Trypanosoma rangeli*: Epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, **82** (2): 363-366, 1996a.
- SALDAÑA, A. & SOUSA, O.E. - *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: Cross-reaction among their immunogenic components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**(1): 81-82, 1996b.
- SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E.; ÖRN, A. - Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: Humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. **Scand. J. Immunol.**, **42**: 644-650, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. - Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor; 2001.
- SANCHEZ, D.O.; MADRID, R.; ENGEL, J.C.; FRASCH, A.C.C. - Rapid identification of *Trypanosoma cruzi* isolates by “dot-spot” hybridization. **Febs.**, **168**: 139 – 142, 1984.

- SCHONIAN, G.; SCHWEYNOCH, C.; ZLATEVA, K.; OSKAM, L.; KROON, N.; GRASER, Y.; PRESBER, W. - Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **77**(1): 19-29, 1996.
- SCHOTELIUS, J. - Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop. Med. Parasit.**, **38**: 323-327, 1987.
- SIBLEY, L.D. & BOOTHROYD, J.C. - Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, **359**: 82-85, 1992.
- SILBER, A.M.; BUA, J.; PORCEL, B.M.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M. - *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. **Exp. Parasitol.**, **85**: 225 – 232, 1997
- SOM, I.; AZAM, A.; BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. - Inter- and intra-strain variation in the 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer sequence of *Entamoeba histolytica* and comparison with *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba invadens*. **Int. J. Parasitol.**, **30**: 723 – 728, 2000.
- SOLANO, P.; DUVALLET, G.; DUMAS, V.; CUISANCE, D. and CUNY, G. - Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). **Acta Tropica**, **65**(3): 175-180, 1997.
- SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGELES, B. - DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **83**: 141 – 152, 1996.

- SOUTO, R.P., VARGAS, N.; ZINGALES, B. - *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Exp. Parasitol.**, **91**: 306 – 314, 1999.
- SOUSA, O.E. & JOHNSON, C.M. - Frequency and distribution of *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* in the Republic of Panamá. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **20** (3): 405 – 410, 1971.
- STEINDEL, M. - Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina. Minas Gerais, 1993, 164 p. (Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- STEINDEL, M.; CARVALHO PINTO, C.J.; TOMA, H.K.; MANGIA, R.H.R.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J. - *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86** (1): 73 – 79, 1991.
- STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; CARVALHO PINTO, C.J.; ROMANHA, A.J. - Presence of *Trypanosoma cruzi* – *Trypanosoma rangeli* mixed infection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87** : 99 – Suppl. II, 1992.
- STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C.L.P.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, A.J.G. - Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **60**: 71 – 80, 1993.
- STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; CARVALHO PINTO, C.J.; GRISARD, E.C.; MENEZES, C.L.P.; MURTA, S.M.F.; SIMPSON, A.J.G.; ROMANHA,

- A.J. - Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J. Euk. Microbiol.**, **41** (3): 261 – 267, 1994.
- STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M.G.; BINGLE, L.E.; GIBSON, W.C. - The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Int. J. Parasitol.**, **29**: 749 – 757, 1999.
- STURM, N.R.; FERNÁNDEZ, O.; CAMPBELL, D. – The mini-exon gene of three *Phytomonas* isolates that differs in plant tissue tropism. **FEMS Micro. Letters**, **130**: 177-182, 1995.
- STURM, N.R.; MURTHY, V.K.; GARSIDE, L.; CAMPBELL, D.A. – The mini-exon gene of *Trypanosoma (Nannomonas) simiae*: Séquence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. **Acta Tropica**, **71**: 199-206, 1998.
- SULLIVAN, J.J.; STEURER, F.; BENAVIDES, G.; TARLETON, R.L.; EBERHARD, M.L.; LANDRY, S. – Trypanosomes and microfilariae in feral owl and squirrel monkeys maintained in research colonies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **49**: 254 – 259, 1993.
- TANAKA, T. – Differential diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infection by PCR of cysteine proteinase genes. **J. Jap. Ass. Infect. Dis.**, **71**: 903-909, 1997.
- TEJERA, E. – Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, (*Trypanosoma* ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. **Bullet. Soc. Pathol. Exotique**, **13**: 527, 1920.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. - The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nuc. Ac. Res.**, **25**: 4876-4882, 1997.
- TIBAYRENC, M. – Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Int. J. Parasitol.**, **28** : 85 – 104, 1998.

- TIBAYRENC, M. – Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, **50**: 401 – 429, 1996.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. - Towards a population genetics of micro-organisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **P. Today**, **7**: 228-232, 1991.
- TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; 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.**, **87** (7): 2414 – 2418, 1990.
- TOBIE, E.J. - Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. **J. Parasitol.**, **51** (5): 837 – 841, 1964.
- TOVAR, D.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. – *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera 1920, Study of the effects of the parasite on the vector. **Acta Cient. Venez.**, **40**: 208 – 214, 1989.
- URDANETA-MORALES, S. & TEJERO, F. – *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*: Observations upon pleomorphism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**(4): 511-516, 1992.
- VAGO, A.R. – Desenvolvimento da técnica de LSSP-PCR (Low Stringency Single Specific Primer – PCR) e sua aplicação ao estudo da doença de Chagas. Minas Gerais, 1996, 119p. (Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- VARGAS, N.; SOUTO, R.P.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A.; ZINGALES, B. - Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potencial application in epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, **96**: 147 – 159, 2000.

- VALLEJO, G.A.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. – Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **67**: 245-253, 1994.
- VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M. - Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, **72** (2): 203 – 212, 1999.
- VALEJJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; LOZANO, L.E.; SÁNCHEZ, J.L.; JARAMILHO, J.C.; GUALTERO, D.; CASTAÑEDA, N.; SILVA, J.C.; STEINDEL, M. – kDNA markers define two major *T. rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Tropica**, **81** (1): 77 – 82, 2002a.
- VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; MORENO, J.; TRIANA, O.; GRISARD, E.C. - Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect. Gen. Evol.**, **67**: 1-7, 2002b
- VARGAS, N.; SOUTO, R.P.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A.; ZINGALES, B. – Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potencial application in Epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, **96** (3): 147 – 159, 2000.
- VICKERMAN, K. - The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: LUMDSEN, W.H.R. & EVANS, D.A. Biology of the Kinetoplastida. Vol.1. London; Academic Press; 1976; p. 1-34.
- WAGNER, W. & SO, M. - Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. **Infect. Immun.**, **58**(10): 3217-3224, 1990.

- XINGQUAN, Z.; CHILTON, N.B.; JACOBS, D.E.; BOES, J.; GASSER, R.B. – Characterisation of *Ascaris* from human and pigs hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. **Int. J. Parasitol.**, **29**: 469-478, 1999.
- ZAVALA-CASTRO, J.E.; VELASCO-CASTREJON, O.; HERNANDEZ, R. - Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**(2): 201-209, 1999.
- ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R.S. - Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 159 – 164, 1999.