

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES rRNA 5.8S E ITS
FLANQUEANTES Y *Cyt b* DE *Trypanosoma cruzi* I, CEPA SYLVIO X10**

CLAUDIA INFANTE JAIMES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2012

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES rRNA 5.8S E ITS
FLANQUEANTES Y *Cyt b* DE *Trypanosoma cruzi* I, CEPA SYLVIO X10.**

CLAUDIA INFANTE JAIMES

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Bióloga

DIRECTOR

JORGE HERNANDEZ TORRES

Ph. D. Biología molecular

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2012

A mi madre y mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Sin el apoyo de muchas personas este trabajo no hubiese sido posible, mis agradecimientos al profesor Jorge Hernández Torres, Katherine Luna Marín y Oriana Serna.

A mis amigos que me acompañaron durante todo este tiempo, especialmente a las que fueron mis vecinas y amigas: Angie Tamara y Viviana Rodríguez.

CONTENIDO

	Pag
INTRODUCCION	9
1. MATERIALES Y METODOS	14
1.1 Extracción de ADN total	14
1.2 Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
1.3 Caracterización molecular de los genes rRNA 5.8S e ITS1 y 2 y Cyt b	15
1.4 Edición y análisis de las secuencias de ADN	15
2. RESULTADOS	16
2.1 Caracterización molecular del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2	18
2.2 Búsqueda de secuencias homólogas del fragmento ITS1—rRNA 5.8S— ITS2	22
2.3 Análisis de agrupamiento entre clones ribosomales de la cepa Sylvio X10	23
2.4 Conservación de la secuencia codificante del gen 5.8S rRNA	23
2.5 Análisis de agrupamiento en <i>T. cruzi</i> I (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2)	25
2.6 Análisis de agrupamiento de la región ITS2 de <i>T. cruzi</i>	26
2.7 Alineamiento de secuencias parciales de genes rRNA 5.8S de Sylvio X10, cl 1	27
2.8 Caracterización del gen molecular del fragmento de 516 bp del gen <i>Cyt b</i>	30

3. DISCUSION	31
4. CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	40

LISTA DE FIGURAS

	Pag
FIGURA 1. Extracción de ADN total de <i>T. cruzi</i> I Sylvio X10 (ATCC 50823)	16
FIGURA 2. Gel de agarosa con el producto de 1300 pb del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2	17
FIGURA 3. Gel de agarosa con el producto de 516 bp del gen <i>Cyt b</i>	18
FIGURA 4. Gel de agarosa para la discriminación entre plásmidos Recombinantes (Flechas blancas) y no recombinantes de la librería del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2	20
FIGURA 5. Mapa de restricción de los clones del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de <i>T. cruzi</i> I Sylvio X10 (ATCC 50823)	
FIGURA 6. Agrupamiento de un fragmento de 630 pb común en las secuencias de Sylvio X10. SE: Secuencia de referencia AF362825.1	23
FIGURA 7. Agrupamiento generado a partir de la región del gen rRNA 5.8S	24
FIGURA 8. Agrupamiento del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 entre secuencias capturadas de Genbank y las secuencias de Sylvio X10	25
FIGURA 9. Agrupamiento generado por el método de Neighbor-Joining entre la región ITS2 de los clones de Sylvio X10 y cepas de Brasil y Colombia	
FIGURA 10. Alineamiento entre secuencias parciales de la región ITS1 de Sylvio X10 clon 1 (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2) con el clon 8 del presente trabajo	28
FIGURA 11. Alineamiento entre secuencias parciales de la región rRNA 5.8S—ITS2 de Sylvio X10 clon 1 (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2) con el clon 8 de este trabajo	29

LISTA DE ANEXOS

	Pag
Anexo A. Programa de amplificación por PCR del gen rRNA 5.8S e ITS 1 y 2	40
Anexo B. Listado de secuencias homologas descargadas de Genbank	41
Anexo C. Alineamiento con el programa Clustal W, de 6 de los clones Aislados del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, de <i>T. cruzi</i> I cepa Sylvio X10 (ATCC 50823)	42
Anexo D. Alineamiento con el programa ClustalW, de la región común de 632 pb de los 6 clones aislados del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de <i>T. cruzi</i> I cepa Sylvio X10 (ATCC 50823)	45
Anexo E. Alineamiento con el programa ClustalW, de la región ITS2 de los clones aislados de <i>T. cruzi</i> I cepa Sylvio X10, ATCC 50823, con la misma región de cepas colombianas y brasileñas	47
Anexo F: Alineamiento con el programa ClustalW, del gen rRNA 5.8S de los 6 clones aislados de <i>T. cruzi</i> I cepa Sylvio X10, ATCC 50823, con la misma región de cepas colombianas y brasileñas	52

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES rRNA 5.8S E ITS FLANQUEANTES Y *Cyt b* DE *Trypanosoma cruzi* I, CEPA SYLVIO X10.

AUTOR: Claudia Infante Jaimes

PALABRAS CLAVE: Heterogeneidad genética, *Trypanosoma cruzi*, ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, multiclonalidad, Sylvio X10.

CONTENIDO

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado que ocasiona la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Es un organismo conocido por ostentar una amplia heterogeneidad genética correlacionada con tropismo tisular, signos clínicos de la enfermedad o distribución de las DTUs. Sin embargo, aun existe incertidumbre sobre la confiabilidad de la clasificación actual en seis grupos o DTUs (Unidades discretas tipificadas), en parte por la insuficiencia en la caracterización de los marcadores utilizados. En este Trabajo de Grado se hizo un análisis bioinformático de secuencias del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de *T. cruzi* I (cepa Sylvio X10 (ATCC 50823)), obtenidas de librerías construidas mediante amplificación por PCR y clonación en los vectores CloneJET® (Fermentas) y GEM T-easy® (Promega). Los resultados reflejan alta conservación del gen rRNA 5.8S y una relativa variabilidad entre las regiones ITS, lo cual concuerda con variación en las repeticiones de los clusters de genes ribosomales. De otro lado, los análisis de distancia demuestran que la variabilidad de las regiones intergénicas no es suficientemente discriminante para distinguir unas cepas de otras. Esto, debido a la existencia de variabilidad intragenómica que hasta el presente, no se conocía ni ha sido reportada en *T. cruzi*.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres Ph. D. Biología Molecular

Codirectora: M.Sc Katherine Luna Marín

ABSTRACT

TITLE: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF rRNA 5.8S e ITS AND Cyt b GENES IN *Trypanosoma cruzi*, CEPA SYLVIO X10.

AUTHOR: Claudia Infante Jaimes

KEYWORDS: Genetic heterogeneity, *Trypanosoma cruzi*, ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, multiclonality, Sylvio X10.

CONTENT

Trypanosoma cruzi is a flagellate protozoan that causes Chagas disease or American trypanosomiasis. It is a microorganism known by its wide genetic heterogeneity correlate with clinic symptoms of the disease, tissue tropism and geographical dispersion of the DTUs. However, there is still uncertainty about the reliability of the current classification, in part because of the failure in the characterization of the markers used. In this work, a bioinformatic analysis of sequences of the fragment ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of *T. cruzi* I (Sylvio X10 strain (ATCC 50823)) has been achieved. Clones were obtained from libraries constructed by PCR amplification and cloning in vectors CloneJET ® (Fermentas) and pGEM® T-easy (Promega). Results show high conservation of 5.8S rRNA gene and relative variability between ITS regions. However, our analysis shows that the variability range of the regions is not sufficiently discriminating to distinguish among strains. That variation is due in part to polymorphisms in the ribosomal genes clusters. This is due to the existence of intragenomic variability that until now, was unknown in *T. cruzi*.

* Thesis

** Faculty of Sciences. Biology Department. Director: Jorge Hernández Torres Ph. D. Molecular Biology

Codirector: M.Sc Katherine Luna Marín

ABREVIATURAS

CINBIN:	Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular
CINTROP:	Centro Internacional de Investigaciones Tropicales
Cyt b:	Gen codificante para la proteína citocromo b
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
dTTP:	Desoxitimina trifosfato
dNTPs:	Desoxinucleósidos trifosfato
DTU:	<i>Discrete Typing Units</i> (Unidad discreta tipificada)
ITS1:	<i>Internal Transcribed Spacers</i> (Espaciadores Internos Transcritos)
kb:	Kilobases
mM:	Milimolar
Min:	Minutos
M:	Molar
ng:	nanogramos
pb:	Pares de bases
RAPD:	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
s:	Segundos
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TE:	Tris-EDTA
TcI –TcVI:	<i>Trypanosoma cruzi</i> I a <i>Trypanosoma cruzi</i> VI
μM:	Micromolar

INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado del orden kinetoplastida, familia Tripanosomatidae y es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Esta patología representa para Latinoamérica un serio problema de salud pública, especialmente en zonas rurales donde se estima que cerca de 12 mil a 20 mil personas mueren cada año a causa de la enfermedad (WHO, 2002). En Colombia la tripanosomiasis afecta cerca del 5% de la población y 20% está en riesgo de infección (WHO, 2007).

La diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* ha sido objeto de variados estudios (e.g., Zingales *et al.*, 1999; Tibayrenc, 2003; Macedo *et al.*, 2004; Mejía y Triana, 2005; Pena *et al.*, 2009; Duque *et al.*, 2011; Cámara *et al.*, 2010) y múltiples clasificaciones preferiblemente relacionadas con signos clínicos de la enfermedad y tropismo tisular (Vago *et al.*, 2000). Los primeros análisis moleculares se hicieron por Miles *et al.*, (1977), quienes identificaron patrones de isoenzimas de distintas cepas y propusieron la primera clasificación de *T. cruzi*, en zimodemos I y II. Estudios posteriores aplicando taxonomía numérica, plantearon una tercera división, i.e., zimodemo III (Ready y Miles, 1979).

En principio se planteó que los zimodemos eran grupos homogéneos y podrían estar asociados con la distribución geográfica. Tibayrenc y Le Ray (1984) relacionaron el zimodemo I con cepas de la cuenca amazónica y del ciclo selvático del parásito. El método de clasificación en zimodemos decayó luego de un estudio realizado por Tibayrenc y Ayala (1988), de quince enzimas en 121 aislados de distintas localidades y hospederos, y de los ciclos selvático y doméstico del parásito. Este trabajo derivó en una clasificación en 43 zimodemos y terminó concluyendo que como *T. cruzi* era un organismo diploide, los distintos zimodemos correspondían a variantes alélicas.

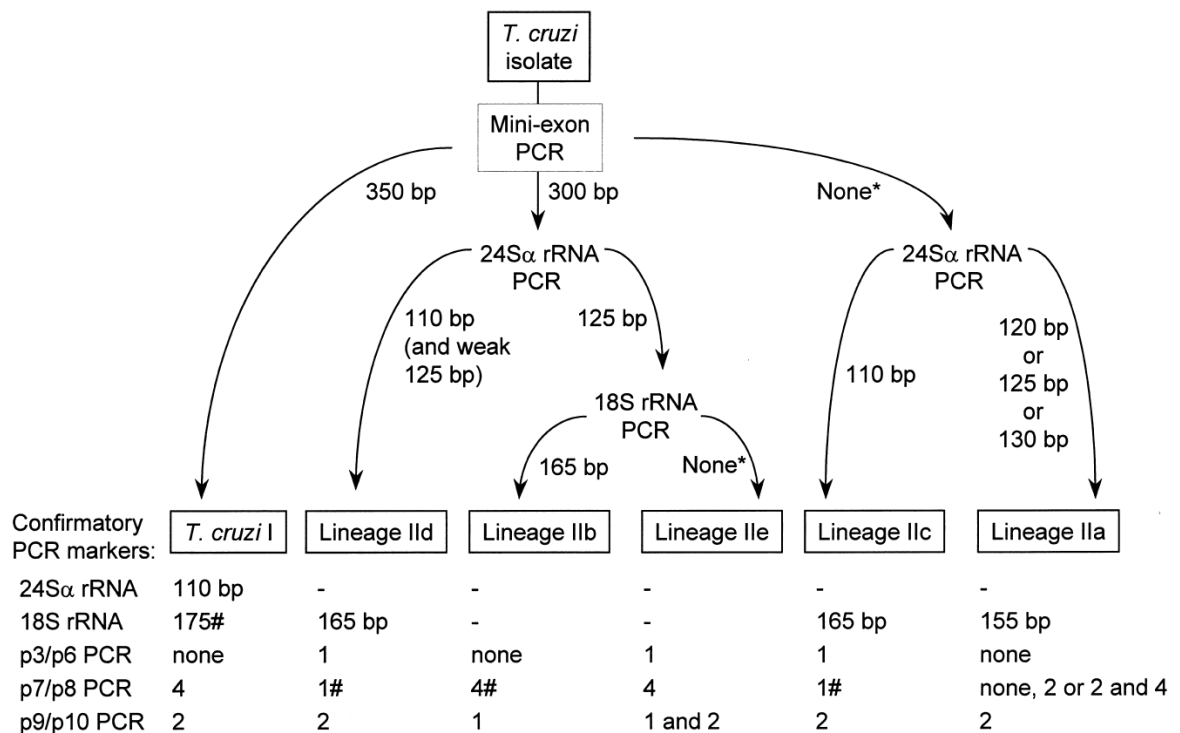
Con el avance en las técnicas moleculares, el análisis de isoenzimas fue remplazado por el uso de marcadores basados en ADN como el gen ribosomal 24S α , genes de mini exón (Fernandes *et al.*, 1988; Souto *et al.*, 1998; Brisse *et al.*, 2001; Cuervo *et al.*, 2002) y RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) (Oury *et al.*, 1997; Brisse *et al.*, 1998). Estos nuevos análisis condujeron a la división del grupo *T. cruzi* en dos linajes principales, 1 y 2. Los polimorfismos en el tamaño del fragmento amplificado del gen 24S α y la agrupación de las secuencias según el linaje fueron determinantes (Souto *et al.*, 1996). Por tal razón el *Satellite Meeting* en Río de Janeiro (1999) recomendó la clasificación de *T. cruzi* en I y II.

Además de los intentos de clasificar la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* con base en marcadores moleculares, los investigadores también han abordado el problema examinando las diferencias en el curso de la infección, los picos de parasitemia en distintos tiempos, la morfología de las formas sanguíneas y las diferencias en infectividad a macrófagos peritoneales de ratón y en cultivos celulares *in vitro* e *in vivo* (Brener, 1977). Sin embargo, estas relaciones no han sido concluyentes, bajo el argumento de que *T. cruzi* es una sola especie aunque politípica (Momen, 1999).

Basados en una revisión de los resultados genéticos y de la estructura clonal del parásito, Tibayrenc y Ayala (1998) y Tibayrenc (2003) propusieron la clasificación de *T. cruzi* en seis DTUs (*Discrete Typing Units*) definidas como “*sets of stocks that are genetically more related to each other than to any other stock and that are identifiable by common genetic, molecular or immunological markers*”. Según este nuevo ordenamiento, los aislados se clasificarían como DTU I y DTU II, éste último subdividido en las cinco DTUs IIa-IIe; el antiguo linaje *T. cruzi* II sería IIb (Tibayrenc, 2003).

En un segundo *Satellite Meeting* llevado a cabo en Buzios (Brazil), las comunidades de expertos reconocieron la nomenclatura en DTUs y recomendaron clasificar las cepas de *T. cruzi* en DTUs I a VI. Bajo este nuevo esquema, DTU I y

DTU II, serían sinónimos de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, respectivamente (Zingales *et al.*, 2009). No obstante, el problema de clasificar *T. cruzi* no parece haber sido resuelto, y en cualquier caso, no se ha podido establecer una nomenclatura basada en pocos marcadores moleculares. La complejidad de las pruebas discriminantes induce a sospechar que aún falta por descubrir mucho de la biología del parásito, antes de considerar resuelto el asunto de la clasificación. El siguiente diagrama de flujo, reproducido de Brisse *et al.*, (Int. J. Parasitol. (2001) 31:1218-1226) esquematiza el entramado de pruebas que se deben practicar a fin de clasificar una cepa en su respectiva DTU:



Otro aspecto de la biología de *T. cruzi*, aún por profundizar y que podría tener un inmenso impacto en la clasificación intraespecífica, es el modo de reproducción entre sexual y asexual. A pesar de que *T. cruzi* es un organismo diploide, se ha venido aceptando la hipótesis de una estructura de población clonal, usualmente

carente de recombinación genética (Tibayrenc y Ayala, 1986). Con base en esta hipótesis, *T. cruzi* se reproduce de manera asexual y cada individuo representa una línea clonal. Además, una cepa aislada de vector o de humano podría ser en realidad una mezcla heterogénea de clones reproducidos asexualmente (Tibayrenc *et al.*, 1995). Esto es lo que sugieren los datos experimentales (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tybayrenc *et al.*, 1991; Pena *et al.*, 2009).

Obviamente, una consecuencia que se deriva de la hipótesis de la clonalidad, sería que la variabilidad genética y morfológica observada en los aislados de *T. cruzi* provendrían de la evolución independiente de líneas de clones (Tibayrenc *et al.*, 1995). Gaunt *et al.*, (2003) consideraron haber demostrado la recombinación *in vitro* de *T. cruzi*, mediante el uso de clones transformados con genes de resistencia a fármacos, como se ha documentado para otros protozoos, parasíticos similares como *Leishmania* (Akopyants *et al.*, 2009) y *Plasmodium* (Bruce *et al.*, 1990).

Para terminar de esbozar el complejo panorama de la genética poblacional de *T. cruzi*, se ha evidenciado la existencia de grupos híbridos, TcV y TcVI, los cuales habrían tenido su origen en un evento de hibridización entre TcII y TcIII (Sturm *et al.*, 2003). Esto significaría que han existido al menos dos eventos de recombinación genética en el pasado (Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2002; Westenberger *et al.*, 2005; lenne *et al.*, 2010).

El CINBIN y el CINTROP han venido desarrollando una línea de investigación de la biología molecular de *T. cruzi*. Los investigadores de los dos grupos de investigación han ido llegando a la conclusión de que el sistema de clasificación de *T. cruzi* debe ser revisado, a la luz de todas las variables anteriormente descritas. Igualmente, consideran que algunos marcadores moleculares utilizados no han sido caracterizados en profundidad, y por lo tanto, aún existen inconsistencias en el sistema de clasificación del parásito, el cual se debe simplificar.

Por lo anterior, teniendo en cuenta la compleja clasificación y la probable reproducción clonal de *T. cruzi*, se planteó como objetivo general de esta pasantía, estudiar en detalle la secuencia del gen del rRNA 5.8S (nuclear) y sus ITS flanqueantes, y el gen *Cyt b* (mitocondrial), secuencias aún no publicadas, en la cepa de referencia de *T. cruzi* / Sylvio X10 (ATCC 50823). El propósito, es el de iniciar una caracterización más detallada de los marcadores moleculares que se usan para clasificar a *T. cruzi* y aportar indicios sobre el comportamiento clonal de la especie.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 Extracción de ADN total

El ADN total fue extraído de células de *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio X10 (Accesión ATCC 50823) en cultivo líquido, no cuantificadas. Las células fueron concentradas por centrifugación a 12000 *g* por 1 min. El sedimento fue resuspendido en 567 μ l de buffer TE (pH 8.0), 30 μ l de 10% SDS y 3 μ l de 20 mg/ml Proteinasa K e incubado a 37 °C durante 1h. Se adicionaron 100 μ l de solución 5 M de NaCl y se mezcló con vórtex. A continuación, se agregaron 80 μ l de CTAB-NaCl y se incubó a 65 °C por 10 min. Después de este paso de lisis, se realizó la extracción de ADN por el método de fenol: cloroformo (Hills *et al.*, 1996).

1.2 Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El gen rRNA 5.8S y sus ITS flanqueantes se amplificaron usando oligonucleótidos específicos con la secuencia complementaria del gen 18S (ITS 1) 5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3' y del gen 24S α (ITS-2) 5'-GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3' (Santos *et al.*, 2002). La mezcla de reacción de 25 μ l contenía: 1X buffer, 4 mM MgCl₂, 300 μ M de dNTPs, 0.16 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 1.25 U de *Taq* polimerasa (Fermentas), 30-50 ng de DNA. La rutina de amplificación *Touchdown* se realizó en un termociclador Max Pro (ESCO), bajo las condiciones de la Tabla 1 (ver Anexo 1).

El gen *Cyt b* fue amplificado, usando los oligonucleótidos específicos p18 con la secuencia complementaria (5'-GACAGGATTGAGAAGCGAGAGAG-3') y p20 (5'-CAAACCTATCACAAAAGCATCTG-3') (Spotorno *et al.*, 2008). Las reacciones de PCR de 25 μ l contenían: 1X buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de los oligonucleótidos p18 y p20, 1.25 U de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 30-50 ng de ADN. La rutina de amplificación se realizó con una desnaturalización a 94 °C por 3 min y 35 ciclos a 94 °C por 35 s, hibridización a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C. Finalmente, una extensión a 72 °C por 3 min. Las reacciones se llevaron a

cabo en un termociclador Max Pro (ESCO). Los productos fueron verificados en geles 0,8% agarosa coloreados con EZ Vision III (Amresco®). La purificación de los productos se hizo en columna con el GeneJET PCR™ PCR Purification Kit (Fermentas).

1.3 Caracterización molecular de los genes rRNA 5.8S e ITS1 y 2 y *Cyt b*

Los productos PCR purificados del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de 1300 pb y el gen *Cyt b* se clonaron en los vectores CloneJET® (Fermentas) y pGEM T-easy® (Promega) siguiendo los protocolos del proveedor. Con el producto de las ligaciones, se transformaron células competentes de alta eficiencia de *E. coli* JM109, mediante el método de CaCl₂ (Sambrock, 1989). Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de acuerdo con el método propuesto por Zhou *et al.*, (1990). Los clones recombinantes se seleccionaron a partir de la visualización en geles 0.8% agarosa coloreados con EZ Vision III (Amresco). La secuenciación de los insertos fue contratada con la empresa Macrogen (Corea).

1.4 Edición y análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias de los clones fueron editadas manualmente para eliminar nucleótidos del vector. La naturaleza de los amplificados se determinó mediante búsqueda de secuencias con BlastN (Altschul *et al.*, 1990), contra las bases de datos de Genbank y EMBL. Con la herramienta BlastN y FASTA se capturaron secuencias de cepas de *T. cruzi* Brasileñas y Colombianas, disponibles en Genbank y EMBL, para el gen rRNA 5.8S e ITS flanqueantes (Anexo 2). Los alineamientos de secuencias se hicieron con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1990). Matrices de distancia fueron construidas bajo el método de Neighbor-joining (Saito y Nei, 1987) y árboles de similitud con MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Con el programa BioEdit (Hall, 1999) se realizó una búsqueda en los *contigs* de los genomas de CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005) y Sylvio X10 cl1 (Franzen *et al.*, 2011), para obtener secuencias completas del gen ribosomal.

2. RESULTADOS

Para caracterizar en detalle la secuencia del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de 1300 pb y del gen *Cyt b* de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823), se empezó por extraer ADN total de cultivos celulares. Para verificar la calidad y la cantidad de ADN extraído, se depositaron alícuotas en geles de agarosa. En la Fig. 1 se muestran extractos concentrados y diluciones para reacciones de PCR. En el carril 2 de la Fig. 1 se aprecia el ADN genómico de un peso molecular >10000 pb, lo cual indica que el ADN sufrió un elevado nivel de ruptura. Interesantemente, se observaron dos bandas adicionales de 1500 y 1800 pb, que deberían corresponder a los RNA ribosomales (Hernández *et al.*, 1990) ya que los extractos de DNA no fueron tratados con ninguna RNAsa.

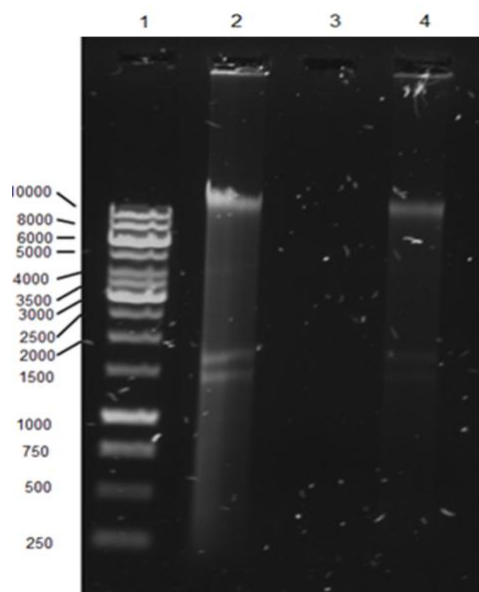


Figura 1. Extracción de ADN total de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823). 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 2: Extracto de ADN concentrado a 100 ng/μl; 4: dilución de trabajo 30-50 ng/μl.

Se procedió a amplificar mediante PCR el fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, usando los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, diseñados por Santos *et al.*, (2002).

Aunque estos cebadores no son totalmente específicos, ya que fueron concebidos con base en un consenso del grupo tripanosomátidos, se obtuvo el producto esperado de 1300 pb (Fig. 2, carriles 2 y 3). Este mismo fragmento ya había sido empleado en nuestro laboratorio para experimentos de PCR-RFLP (Luna-Marín et al., 2009). Por otra parte, el gen *Cyt b* también se amplificó, con los oligonucleótidos p18 y p20 usados por Spotorno et al., (2008) en un estudio de caracterización de cepas chilenas de *T. cruzi* I (Fig. 3). Es de anotar que aunque el segmento parcial del gen *Cyt b* se observa de un tamaño ligeramente superior en relación con el marcador de peso molecular, es sabido que muestras de ADN con concentraciones salinas diferentes de las del marcador tienden a cambiar la movilidad del ADN (Smith et al., 1983). Este puede ser el caso, porque tanto el búfer de carga (diferente del que contiene el marcador), como el 1X *Taq buffer* añaden sales adicionales a las muestras.

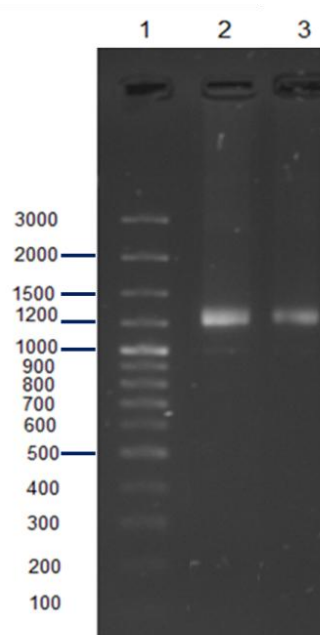


Figura 2. Gel de agarosa con el producto de 1300 pb del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 (carriles 2 y 3) Carril 1: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

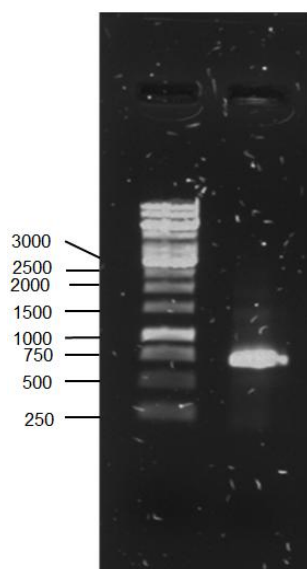


Figura 3. Gel de agarosa con el producto de 516 bp del gen *Cyt b* (carriles 2 y 3) Carril 1: GeneRuler™ 1 Kb ladder (Fermentas).

2.1 Caracterización molecular del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2

Estudios previos en los laboratorios del CINBIN y el CINTROP han evidenciado polimorfismos en los patrones de PCR-RFLP del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, entre diferentes cepas de *T. cruzi* I, aisladas tanto de vector como de humano, incluyendo la cepa Sylvio X10. (Luna-Marín *et al.*, 2009). En su momento, este resultado se interpretó como probablemente relacionado con la multiclonalidad del parásito.

Como aún no se han alojado las secuencias nucleotídicas de los genes para rRNA de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823) en Genbank o EMBL, siendo una de las cepas de referencia más caracterizadas en el mundo, se procedió a determinarlas en nuestro laboratorio. Más de una variante de la secuencia del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 sería el indicador de una de dos alternativas: i) multiclonalidad de la cepa Sylvio X10 ó ii) diversas formas del mismo segmento génico debido a variaciones individuales en el curso de la evolución, de los *clusters* de genes

ribosomales (Eickbush y Eickbush, 2007). Se estima que en el genoma de *T. cruzi* existen 219 genes de rRNA (El-Sayed et al., 2005).

Por lo anterior, se construyeron librerías del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823) con el vector CloneJET® (Fermentas) y pGEM T-easy® (Promega). Se consideró que para responder a nuestras hipótesis, 10 clones plasmídicos recombinantes serían suficientes para comprobar si todos contenían la misma secuencia nucleotídica o albergaban polimorfismos.

Es sabido que la *Taq* DNA polimerasa adiciona una dA cadena sencilla en 3' de los extremos del amplificado. El vector CloneJET® (Fermentas) permite subsanar este problema mediante pre-tratamiento del amplificado con una exonucleasa, antes de la ligación. Sin embargo, observamos que la nucleasa tiende a degradar mayor cantidad de nucleótidos en los extremos, produciendo clones parciales.

Por otro lado, los expertos de Promega Inc. resuelven el problema de la A en 3' del inserto, con el vector pGEM T-easy®. Este plásmido lineal es portador de una T sobresaliente en 5', complementario de la A en 3' del producto PCR. Lo que observamos, fue que el amplificado debería ser separado de los sub-productos de la PCR, tipo dímeros de *primer*, ya que los pequeños fragmentos de ADN tienen mayor probabilidad de ligarse con el vector y su número fue muy superior al de los clones esperados.

Debido a estos problemas de orden técnico, sólo se obtuvieron 7 clones, tres de ellos parciales, de un total de 100 colonias recombinantes. Los demás insertos fueron descartados por ser muy cortos o de tipo dímero de *primer*. No sobra aclarar —como veremos más adelante— que las regiones ITS son ricas en A+T y esto hace que el dATP y el dTTP del medio de amplificación se agoten prematuramente, inhibiendo la ligación y promoviendo la aparición de clones parciales.

Con el fin de economizar los recursos, la distinción entre plásmidos recombinantes y no recombinantes se hizo observando la disparidad en la migración de la forma superenrollada en geles de agarosa, usando como referencia un plásmido no recombinante. En la Fig. 3 se aprecia la separación electroforética sobre gel de agarosa de 13 clones, 5 de ellos recombinantes, los cuales se enviaron a Macrogen para secuenciación.

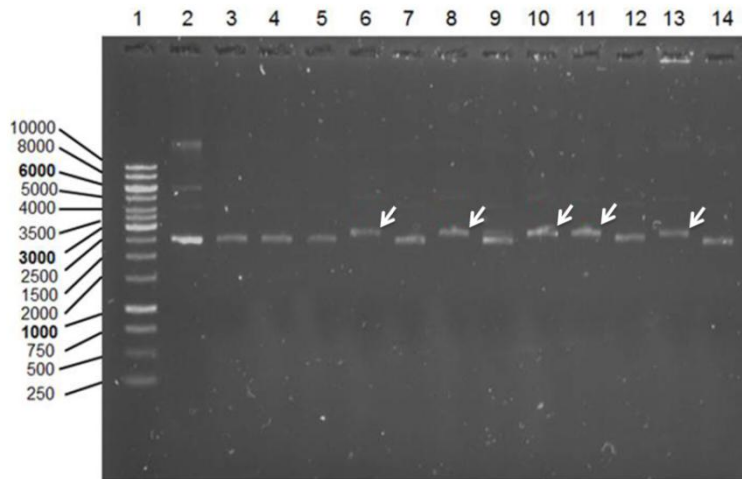


Figura 4. Gel de agarosa para la discriminación entre plásmidos recombinantes (flechas blancas) y no recombinantes de la librería del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2. 1: GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Fermentas). 2: plásmido no recombinante de referencia. 3-5, 7, 9, 12 y 14: plásmidos no recombinantes. 6, 8, 10, 11 y 13: plásmidos recombinantes.

Como resultado del aislamiento de clones de las librerías, se logró la purificación de los clones 6 (965 pb en 3'), 8 (1213 pb), 11 (1204 pb), 20 (875 pb en 5'), 1c (1204 pb), 8b (1212 pb), y 9b (696 pb en 3') del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2. Las secuencias de todos los clones se alinearon con el programa ClustalW, junto con una secuencia homóloga de referencia en *T. cruzi* I aislado SE (Santos et al., 2002). En el Anexo 3, se puede observar que el gen rRNA 5.8S está perfectamente conservado entre todos los clones (99% de identidad), pero no con la secuencia del aislado SE. No obstante, el clon 8b contiene una G polimórfica en lugar de A, en el nucleótido 19 del gen (G en rojo, Anexo 3). Es de mencionar que la secuencia del aislado SE podría contener errores de secuenciación, a juzgar por

bastantes posiciones no concluyentes, denotadas como N y la presencia de *indels*. Por otra parte, el alineamiento evidencia que las secuencias de las regiones ITS presentan variaciones nucleotídicas entre ellas, lo que constituye un importante resultado que se discutirá más adelante.

Con base en el alineamiento, se construyó un mapa de restricción con las enzimas utilizadas en un trabajo experimental previamente publicado por los dos grupos de investigación (Luna-Marín et al., 2009). En la Fig. 5 se reportan los sitios de restricción para la enzima *RsaI*. Como puede apreciarse, se destacan dos polimorfismos en los sitios de restricción: El clon 8b no presenta el sitio de restricción *RsaI* en la posición 60 y los demás clones, incluido el aislado de Santos et al., (2002), sí lo contienen. Por otra parte, los clones 11 y 8b presentan un sitio *RsaI* en la posición 200, que no se encuentra en los demás clones ni en la secuencia de referencia. Los sitios de restricción para las enzimas *TaqI*, *BstI* y *HaeIII*, son comunes para todos los clones y no se incluyeron en la Fig. 5.

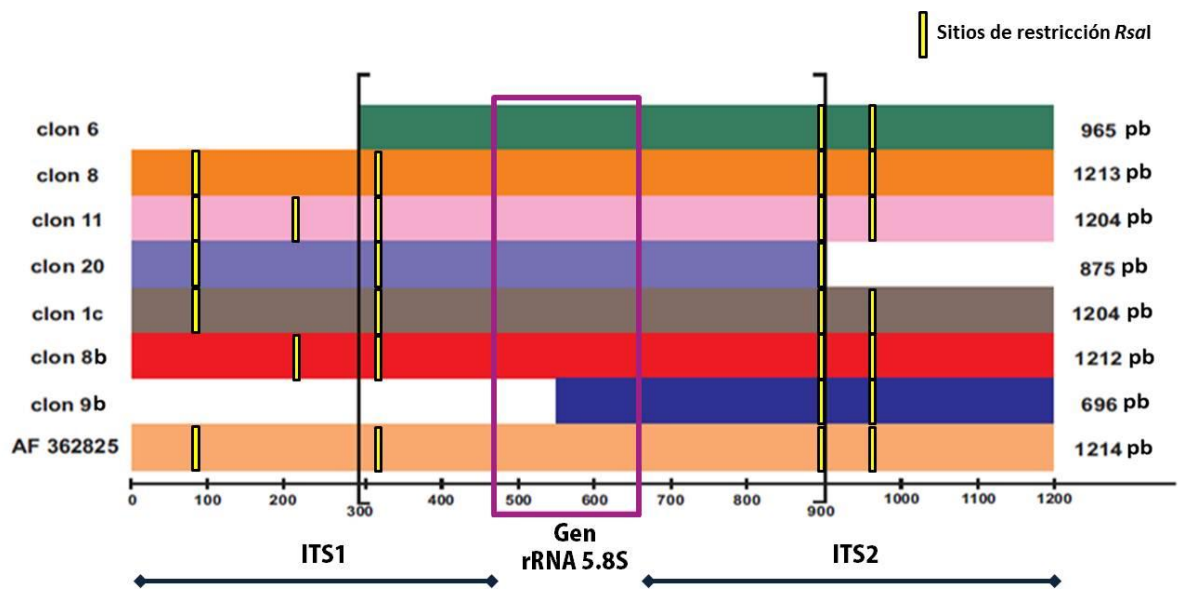


Figura 5. Mapa de restricción de los clones del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823). El gen rRNA 5.8S está demarcado por un rectángulo vertical violeta. Las regiones ITS1 y 2 se subrayan en color negro.

2.2 Búsqueda de secuencias homólogas del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2

Con el fin de verificar si nuestras secuencias de *T. cruzi* I Sylvio X10 ya habían sido previamente caracterizadas, se hicieron búsquedas exhaustivas en las bases de datos Genbank y EMBL, entre otras. Con la herramienta BlastN y las secuencias obtenidas en este trabajo, se descargaron todas las secuencias disponibles del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2. A pesar de un intensivo ejercicio de alineamientos, el máximo valor de identidad que se obtuvo fue de 95%. Es decir, las secuencias aquí reportadas son totalmente nuevas y nuestra intención es hacerlas públicas en el momento oportuno.

Por otra parte, según la literatura científica, ya ha habido intentos de secuenciar totalmente el genoma de *T. cruzi*. El primer proyecto se hizo con la cepa CL Brener por estar bien caracterizada biológicamente (El-Sayed et al., 2005). No obstante, la idea fue abandonada porque se descubrió que esta cepa era un híbrido y el análisis de los datos sería extremadamente complejo. Recientemente, se publicó en la revista PLoS Negl Trop Dis un artículo en el que se reportaba la secuenciación del genoma total de *T. cruzi* I Sylvio X10 Clon 1 (Franzen et al., 2011). Como se trataba de un clon de la misma cepa objeto de este Trabajo de Grado, el interés fue muy grande porque se podría contar con la secuencia de los 219 genes que supuestamente contiene. En un intercambio de correos electrónicos, el Dr. Oscar Franzén nos suministró un par de enlaces URL^{1*} donde se alojan las secuencias de los *contigs* sin ninguna otra información disponible. Un análisis exhaustivo con las herramientas informáticas disponibles, permitió llegar a la conclusión de que la secuencia de los genes ribosomales no estaba en esos *contigs*, sino de manera muy parcial. De hecho, se trata de secuencias de unos pocos pares de bases (≈500-1000) y no deberían considerarse como *contigs*.

^{1*} <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ADWP00000000>
http://tritrypdb.org/common/downloads/Current_Release/Tcruzi/fasta/

Nuestra conclusión es que esa información permanece en el dominio privado. A pesar de todo, las pocas secuencias existentes fueron utilizadas para demostrar la existencia de variabilidad intragenómica.

2.3 Análisis de agrupamiento entre clones ribosomales de la cepa Sylvio X10

Una región de 632 pb común a las secuencias de la cepa Sylvio X10 (Fig. 5, región entre corchetes) fue alineada mediante ClustalW, con secuencias capturadas de Genbank (Anexo 4). Con base en matrices de distancia para estas secuencias, se observó heterogeneidad con valores de variabilidad entre 1 y 1.8% (Anexo 7), similaridad que soporta los patrones de las ramas obtenidas con el método de NJ (Fig. 6). Este resultado permitió concluir que existe variabilidad intragenómica en los *clusters* de genes ribosomales de *T. cruzi*.

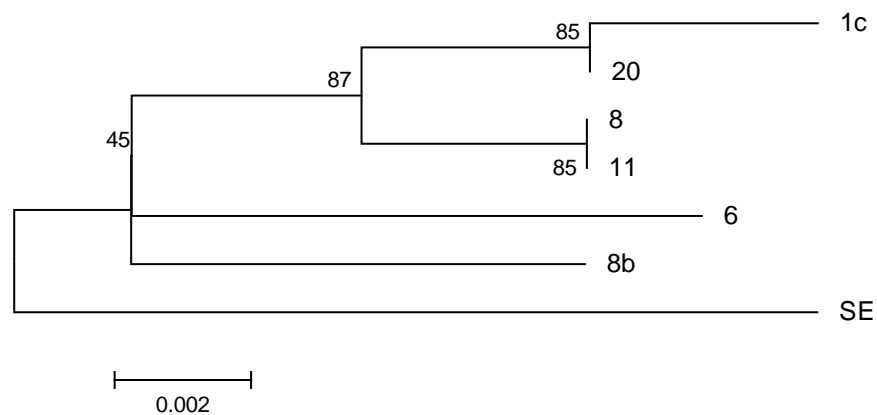


Figura 6. Agrupamiento de un fragmento de 630 pb común en las secuencias de Sylvio X10. SE: Secuencia de referencia AF362825.1.

El árbol fue reconstruido por el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol óptimo tiene longitud de ramas = 0.04173034 y está dibujado a escala. Las distancias fueron calculadas usando el método de Kimura 2-parámetros. (Kimura, 1980). El análisis involucra 7 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones con *gaps* y datos perdidos fueron eliminadas con un total de 607 posiciones en el set de datos final. El análisis fue realizado en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

2.4 Conservación de la secuencia codificante del gen 5.8S rRNA

En la Fig. anterior se demostró variabilidad intragenómica en los *clusters* de genes ribosomales de *T. cruzi* Sylvio X10. No obstante, el fragmento de 632 pb utilizado

para las matrices de distancia incluía 166 pb del gen rRNA 5.8S y como el gen es más conservado que las regiones ITS (Hillis y Dixon, 1991), el árbol anterior no refleja el verdadero grado de identidad del gen rRNA 5.8S. Por lo anterior, se construyó una matriz de distancia exclusivamente con la secuencia codificante para el rRNA 5.8S de secuencias disponibles en Genbank. Se incluyeron los clones de Sylvio X10, secuencias de aislados de *T. cruzi* I y II de Colombia y Brasil, la cepa Esmeraldo (*T. cruzi* II) y el aislado AM11 de *T. rangeli* (Anexos 6 y 7). En los alineamientos, se evidenció un muy alto grado de conservación intraespecífico para el gen rRNA 5.8S, entre la cepa Sylvio X10 y los otros miembros de *T. cruzi* I y II (Fig. 7), según la escala de distancia.

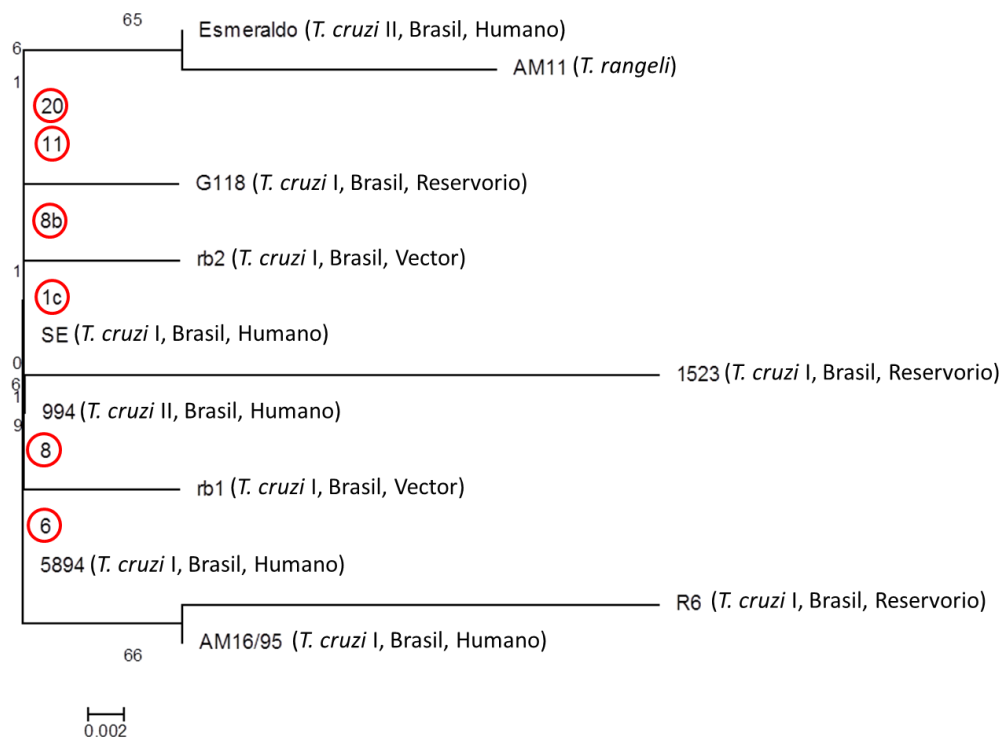


Figura 7. Agrupamiento generado a partir de la región del gen rRNA 5.8S.

El árbol fue inferido usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con longitud de ramas =0.12190144. Las distancias fueron calculadas usando el método de Kimura 2-parámetros. (Kimura, 1980). El análisis involucra 17 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones con *gaps* y datos perdidos fueron eliminadas con un total de 117 posiciones en el *set* de datos final. El análisis fue realizado en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias de los clones obtenidos en este trabajo se muestran rodeadas de círculos rojos. Los números de acceso de las demás secuencias están en el Anexo 2,

excepto para 5894 (AF362828) y 994(AF362829). Entre paréntesis se refieren el grupo taxonómico, la proveniencia geográfica y el hospedero del cual se aisló cada cepa.

Análisis de agrupamiento en *T. cruzi* I (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2)

Un nuevo árbol de distancia del fragmento completo ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 fue generado con secuencias disponibles en Genbank para *T. cruzi* I, II y III. En la Fig. 8, se puede apreciar como era de esperarse, que las secuencias de los clones de Sylvio X10 se agrupan con los demás aislados de *T. cruzi* I y que *T. cruzi* II y III forman grupos aparte. Interesantemente, la cepa Esmeraldo (*T. cruzi* II) se agrupa con *T. rangeli*. No obstante, obsérvese que las secuencias rb1, Am16/95 y 1523 se agrupan con los clones de este trabajo, con valores de distancia mínimos.

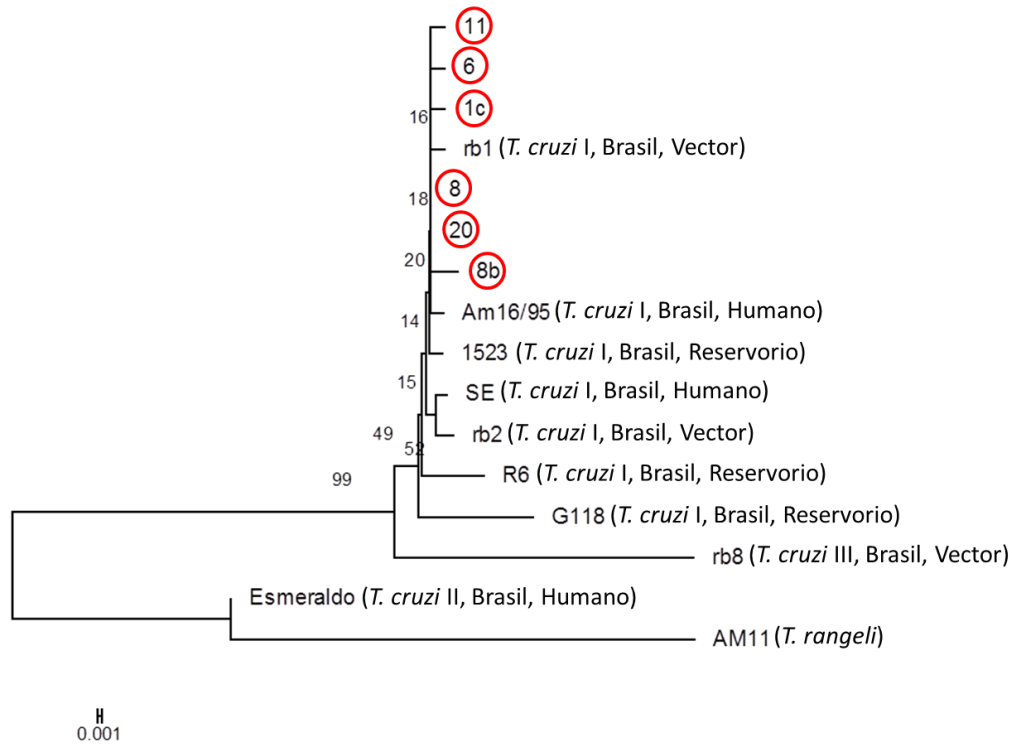


Figura 8. Agrupamiento del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 entre secuencias capturadas de Genbank y las secuencias de Sylvio X10. El árbol fue reconstruido por el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol óptimo tiene longitud de ramas = 0.35940960 y está dibujado a escala. Las distancias fueron calculadas usando el método de Kimura 2-parámetros. (Kimura, 1980). El análisis involucra 16 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones con *gaps* y datos perdidos fueron eliminadas con un total de 345 posiciones en el *set* de datos final. El análisis fue realizado en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias de los clones obtenidos en este trabajo se muestran rodeadas de círculos rojos. Los números de acceso de las demás secuencias están en el Anexo 2. Entre paréntesis se refieren el grupo taxonómico, la proveniencia geográfica y el hospedero del cual se aisló cada cepa.

2.5 Análisis de agrupamiento de la región ITS2 de *T. cruzi*

Especialmente la región ITS2 ha sido utilizada con propósitos taxonómicos y filogenéticos (Da Silva *et al.*, 2004; Luna-Marín, 2009) en *Trypanosoma* sp. Como esta región se encuentra completa en los clones de Sylvio X10 (a excepción del clon 20), las secuencias del ITS2 de 6 de los clones fueron alineadas con ITS2 de otros aislados de *T. cruzi* de Colombia y Brasil (Fig. 9).

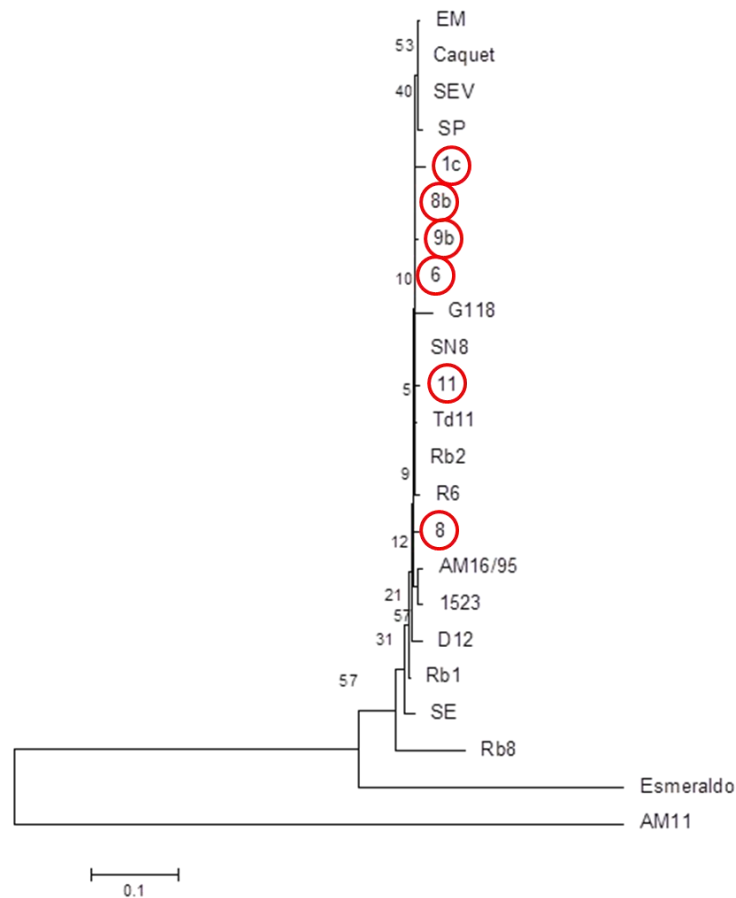


Figura 9. Agrupamiento generado por el método de Neighbor-Joining entre la región ITS2 de los clones de Sylvio X10 y cepas de Brasil y Colombia.

El árbol fue inferido usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con longitud de ramas = 1.63926981. Las distancias fueron calculadas usando el método de Kimura 2-parámetros. (Kimura, 1980). El análisis involucra 23 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones con *gaps* y datos perdidos fueron eliminadas con un total de 354 posiciones en el *set* de datos final. El análisis fue realizado en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias de los clones obtenidos en este trabajo se muestran rodeadas de círculos rojos. Los números de accesoión de las demás secuencias están en el Anexo 2.

Como puede observarse en la Fig. 9, el agrupamiento ocurre según la nomenclatura vigente para *T. cruzi*. Se presentaron polimorfismos en la longitud de las secuencias obtenidas (datos no mostrados). La distancia entre las secuencias ITS2 de Sylvio X10, así como con las de otros aislados de *T. cruzi* I y II, y *T. rangeli* (Anexos 5 y 7,) evidenciaron variabilidad intra e interespecífica, acorde con los agrupamientos visualizados en las topologías. Sin embargo, lo que más se destaca es que los valores de distancia son tan bajos entre las secuencias del grupo *T. cruzi* I que sería difícil distinguirlas con base en este criterio. No sobra mencionar los niveles ligeramente altos en la composición nucleotídica de A+T (58%) en el ITS2 de los clones de Sylvio X10, lo cual es apenas normal en estas regiones del rRNA.

2.6 Alineamiento de secuencias parciales de genes rRNA 5.8S de Sylvio X10, cl 1

Justo en el momento de concluir la etapa experimental de este Trabajo de Grado (octubre de 2012), el grupo de Franzen et *al.*, hizo públicas en Genbank secuencias parciales (mal llamados *contigs*) del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de Sylvio X10, clon 1. En el marco de nuestra pregunta de investigación, esta información es de gran utilidad para comprobar si en un clon único derivado de la cepa Sylvio X10, también ocurre el fenómeno de variabilidad intragenómica del gen rRNA 5.8S. En las Figs. 10 y 11 se muestran alineamientos entre secuencias parciales del gen rRNA 5.8S de Sylvio X10, clon 1. Como puede apreciarse, existen pequeñas variaciones entre las secuencias, indicando que los genes rRNA 5.8S y especialmente los ITS, han sufrido cambios individuales que han dado lugar a variación intragenómica. No se encontraron secuencias parciales idénticas a alguno de los clones del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 aislados en este trabajo

```

ADWP02000879 TATATATA-----TATACGGTTGTGTGTATAAATATATGTTGTACACAC
ADWP02026147 TATATATAATGTAATATACGGTTGTGTGTATAAATATATGTTGTACACAC
CLON8 -----A-AAT-----TATACGGGTGGGTGTGTATAAATATATGTTGTACACAC
          *      **      **      *** **      *****
          → 29

ADWP02000879 ACAATTCAGGCAACAAAACCTCTG--GCGTGTATATATATTACTACTATGCT
ADWP02026147 ACAATTCAGGCAACAAAACCTCTG--GCGTGTATATATATTACTACTATGCT
CLON8 CCAATTCAGGCAACAAAACCTCTGGGCGTGTATATATATTACTACTATGCT
          *** *****

ADWP02000879 ACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTT----GTTGTTGTTGCCGCGCGG
ADWP02026147 ACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTTGTTGTTGTTGCCGCGCGG
CLON8 ACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTT----GTTGTTGTTGCCGCGCGG
          *****

ADWP02000879 GAGAGGATATATACATGTGTACACGCTATTTATATATATAATATAATA
ADWP02026147 GAGAGGATATATACATGTGTACACGCTATTTATATATATAATATAATA
CLON8 GAGAGGATATATACATGTGTACACGCTATTTATATATATAATATAATA
          *****

ADWP02000879 TAGTATATATATATGTGTGTGTGCTGTGCTGCTGCTTCTCTTCGCACTGA
ADWP02026147 TATT-----ATATATGTGTGTGTGCTGTGCTGCTGCTTCTCTTCGCACTGA
CLON8 TAGTATATATATATGTGTGTGTGCTGTGCTGCTGCTTCTCTTCGCACTGA
          ** *      *****

ADWP02000879 TACATATATCCCACACCTTACGTGTATATATATGTATATAATATATAATAT
ADWP02026147 TACATATATCCCACACTTACGTGTATATATATGTATATAATATATAATAT
CLON8 TACATATATCCCACACCTTACGTGTATATATATGTATATAATATATAATAT
          *****

ADWP02000879 ACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATGTAATTGC
ADWP02026147 ACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATGTAATTGC
CLON8 ACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATGTAATTGC
          ** *****

ADWP02000879 GGCTTGACTTCGCGTGTGCACATATATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGT
ADWP02026147 GGCTTGACTTCGCGTGTGCACATATATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGT
CLON8 GGCTTGACTTCGCGTGTGCACATATATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGT
          *****

ADWP02000879 GGTTTATATA--TA-----
ADWP02026147 GGTTTATATATATATATATATATGATTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTG
CLON8 GGTTTATATATATATATATA--TATTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTG
          ***** **
          → 433

```

Figura 10. Alineamiento entre secuencias parciales de la región ITS1 de Sylvio X10 clon 1 (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2) con el clon 8 del presente trabajo. Las posiciones variables se resaltan en cuadros amarillos. Las posiciones 29 y 433 del clon 8 se representan con flechas.

```

ADWP02004563 -----GGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTG
ADWP02019720 AGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTG
Clon 8 AGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTG
*****

ADWP02004563 AACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGC
ADWP02019720 AACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGC
Clon 8 AACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGC
*****

ADWP02004563 CATATTTCTCAGTGT CGAACAAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTC
ADWP02019720 CATATTTCTCAGTGT CGAACAAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTC
Clon 8 CATATTTCTCAGTGT CGAACAAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTC
*****

ADWP02004563 TCTCTATACAAACGCATGCATTCCTGTGTGTGTGTGTGTGGTGGGAGAGG
ADWP02019720 TCTCTATACAAACGCATGCATTCCTGTGTGTGTGTGTGTGGTGGGAGAGG
Clon 8 TCTCTATACAAACGCATGCATTCCTGTGTGTGTGTGTGTGGTGGGAGAGG
*****

ADWP02004563 AGGGGAGGGGAAGGGGAAATGACAAACGACAAAAAAGAGAGGCCCGTTAG
ADWP02019720 AGGGGAGG-GAGGGGGAAAATGCAAACG-CAAAAAAGAGA-GCCC--TTG
Clon 8 AGGGGAGG-GAGGGGGAAAATGCAAACG-CAAAAAAGAGA-GCCC--TTG
*****

ADWP02004563 GGGAGAGACATAGTTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTA
ADWP02019720 GGGAGAGACATA-TTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTA
Clon 8 GGGAGAGACATA-TTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTA
*****

ADWP02004563 TATATATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGTGTGTCTT
ADWP02019720 TATATATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGTGTGTCTT
Clon 8 TATATATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGTGTGTCTT
*****

ADWP02004563 CTGGTGGTGTGGTGCATGATCCGCCCGGCGCTTGTGTGTGTGTTTGTG
ADWP02019720 CTGGTGGTGTGGTGCATGATC-CGCCCGGCGCTTGTGTGTGTGTTT--G
Clon 8 CTGGTGGTGTGGTGCATGATC-CGCCCGGCGCTTGTGTGTGCGTGTTT--G
*****

ADWP02004563 TACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTGTATTGTGTGTGTGTG
ADWP02019720 TACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTGTATTGTGTGTGTGTG
Clon 8 TACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTGTATTGTGTGTGTGTG
*****

```

Figura 11. Alineamiento entre secuencias parciales de la región rRNA 5.8S—ITS2 de Sylvio X10 clon 1 (fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2) con el clon 8 de este trabajo. En color rojo y negrilla se resalta el gen rRNA 5.8S. Las posiciones variables se resaltan en amarillo.

2.8 Caracterización molecular del fragmento de 516 bp del gen *Cyt b*

Los objetivos de esta pasantía incluían también la caracterización del gen mitocondrial *Cyt b* de clones de Sylvio X10, bajo la misma hipótesis. No obstante, datos publicados por Messenger *et al*, (2012), revelan que en el ADN mitocondrial de *T. cruzi* ocurrieron eventos de introgresión y heteroplasmia, lo que quiere decir que el gen *Cyt b* no es apropiado como marcador taxonómico o filogenético.

3. DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi es, tal vez, uno de los parásitos más estudiado en todos los aspectos biológicos, genéticos y clínicos, pero también de los menos entendidos por su extrema complejidad. Un sinnúmero de aproximaciones metodológicas se han aplicado para intentar clasificar al parásito; sin embargo, no se ha podido encontrar uno o varios marcadores que faciliten una clasificación lógica, sencilla y funcional. Además, la probable existencia de la multiclonalidad agrava la dificultad metodológica para abordar la taxonomía del grupo.

En esta pasantía se analizó la secuencia del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2 de *T. cruzi* I Sylvio X10 (ATCC 50823). Aunque recientes publicaciones expresan haber secuenciado el genoma del parásito, las secuencias no están alojadas en las principales bases de datos, ni accesibles por las herramientas bioinformáticas corrientes. No obstante, nuestros resultados son suficientes para concluir que la secuencia de las regiones ITS1 e ITS2 y del gen rRNA 5.8S han sido sobrestimadas como marcador genético para clasificar a *T. cruzi*.

Análisis de PCR-RFLP y de secuencias de los genes ribosomales han sido ampliamente utilizados como marcador molecular en análisis filogenéticos y clasificación en Tripanosomátidos (Cupolillo *et al.*, 1995; Hughes y Piontkivska, 2003). El gen 24S α se usó en la clasificación de *T. cruzi* en seis DTUs (Brisse *et al.*, 2001) al igual que en la clasificación en linajes 1 y 2 por Fernandes *et al.*, en 1998. La secuencia completa del gen 18S ha sido utilizada en estudios de evolución intraespecífica (Kawashita *et al.*, 2001); igualmente, las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) se usaron en filogenias y análisis de agrupamiento a nivel intraespecífico en *T. rangeli* (Da Silva *et al.*, 2004), y también en la identificación de nuevas especies del género *Trypanosoma* (Lima *et al.*, 2012).

Los resultados de este estudio son concluyentes en el sentido de que los marcadores ribosomales no han sido suficientemente caracterizados y por tanto los resultados de los estudios anteriormente relacionados podrían carecer de verosimilitud. Esto, debido a la variabilidad intragenómica observada (Figs. 6 a 11).

En efecto, los análisis de agrupamiento muestran que las secuencias del gen o de las ITS se agrupan indistintamente de las cepas a las que pertenecen. Como supuestamente existen 219 genes ribosomales (El-Sayed et al., 2005), deberán existir 219 variantes polimórficas de cada gen rRNA. En estas condiciones, es muy arriesgado atreverse a emprender estudios taxonómicos con solo unos pocos alelos, como se ha hecho hasta el presente.

Aunque abordar el tema de la multiclonalidad es imposible con los pocos datos obtenidos, sí es de afirmar que los genes ribosomales pueden no ser el marcador ideal para abordar esta gran pregunta. Sin embargo, el hecho de que el gen 5.8S esté tan conservado en todos los clones obtenidos, hace por lo menos sospechar que la hipótesis de multiclonalidad podría no ser real. Si hubiera habido formas diferentes del gen 5.8S, se podría sospechar la existencia de clones sometidos a una deriva genética individual. Contrariamente, nuestros resultados indican un simple fenómeno de duplicación de genes en tándem y mutaciones específicas en cada alelo.

En conclusión, es imperativa una profunda caracterización de los genes rRNA en todos los grupos taxonómicos de *T. cruzi*, antes de pretender utilizarlos como marcadores moleculares discriminantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. *Science* 324:265–268.
- Anónimo, (1999) Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 94 Suppl I: 429–432.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Brener Z (1977) Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Scientific Pub* 347:11–21.
- Brisse S, Barnabe C, Banuls AL, Sidibe I, Noel S (1998). A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol* 92: 253–263.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J Parasitol* 31:1218–1226.
- Brisse S, Henrikson J, Barnabé C, Douzery EJP, Bervenks D, Serrano M, De Carvalho RMC, Buck GA, Dujardin C-J, Tibayrenc M (2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 173–183.
- Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 100:191–200.
- Camara ACJ, Varela-Freire AA, Valadares HMS, Macedo AM, Ávila DA, Machado CR, Lages-Silva E, Chiari E, Galvao MC (2010). Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Tropica* 115:205–211.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O (2002). Genetic diversity of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the Ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 97:877–880.

- Cullings KW, Vogler DR (1998). A 5.8S nuclear ribosomal gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Mol Ecol* 7:919–923.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, Beverley SM (1995) Intergenic region typing (IRT) : A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73: 145-155
- Da Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MM (2004). Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129:549-61.
- Duque MC, Ramirez JD, Rendón LM y Guhl F (2011). Evaluación de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Trypanosoma cruzi* mediante marcadores microsátélites. *Infectio* 15: 227–234
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*. 175:477–85.
- El-Sayed, NM, Myler, PJ, Bartholomeu, DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G *et al.*, (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409–415.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Borges PJ, Carrara FN, Junqueira A, Naif RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, y Coura JR (1998). Brazilian isolates of *trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58(6): 807–811.
- Franzen O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Andersson B (2011). Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *Plos neglected tropical disease* 5, 3:e984.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936–939.
- Hall, TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Heitman J (2006). Sexual reproduction and evolution of microbial pathogens, review. *Curr Biol* 16: 711–725.

Heitman J (2010). Evolution of eukaryotic microbial pathogens via covert sexual reproduction. *Cell Host Microbe* 8: 86–99.

Hernández R, Ríos P, Valdés AM y Piñero D (1990). Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding región: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 41: 207–212.

Hillis DM, Dixon MT (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 66:411-53.

Hills DM, Mable B K, Larson A, Davis SK, Zimmer EA (1996). *Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning*, pp 342-343.

Hughes AL, Piontkivska H (2003) Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) Based on 18S rRNA: Evidence for Paraphyly of *Trypanosoma* and Six Other Genera. *Mol Biol Evol* 20(4):644–652.

lenne S, Pedroso A, Carmona e Ferreira R, Briones MRS, Zingales B (2010). Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary patterns. *infect, Genet Evol* 10:601–606.

Jukes TH and Cantor C.R (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism* pp. 21–132

Kawashita S, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS (2001). Maximum-Likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* 18(12):2250–2259.

Lima L, Da silva FM, Neves N, Attias M, Takata CSA, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Texeira MMG (2012). Evolutionary insights from bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist* 12: 03

Luna-Marín KP, Jaramillo-Londoño CL, Hernández Torres J, Gutiérrez-Marín R, Vallejo GA, Angulo-Silva VM (2009). ITS–RFLP- and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander (Colombia). *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-009-1422-0.

- Macedo MA, Machado CR, Oliveira RP y Pena SDJ (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 99 (1): 1–12
- Mejía MA, Triana O (2005). Análisis de LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. Biomédica 25: 76–86
- Messenger LA, Llewellyn MS, Bhattacharyya T, Franzen O, Lewis MD, et al., (2012). Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. PLoS Negl Trop Dis 6: 1584.
- Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strains groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 71: 217–225.
- Momen H (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: A commentary on characterization and nomenclature. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94: 181–184
- Oury B, Dutrait N, Bastrenta B, Tibayrenc M (1997). *Trypanosoma cruzi*: Evaluation of a RAPD synapomorphic fragment as a species-specific DNA probe. J Parasitol 83: 52–57.
- Pena SDJ, Machado CR, Macedo AM (2009). *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 104: 108–114.
- Ready PD y Miles MA (1979). Delimitation of *Trypanosoma zimodemos* by numerical taxonomy. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene 74:2.
- Saitou N y Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425.
- Sambrook J, EF Fritsch, y Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A (2002). The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning

of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol* 96:755–764.

Smith SS, Gilroy TE, Ferrari FA (1983). The influence of agarose-DNA affinity on the electrophoretic separation of DNA fragments in agarose gels. *Anal Biochem* 128:138–51.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83:141–152.

Spotorno AE, Cordova L, Solari A (2008). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 898–900.

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 33: 269–279.

Tamura K, Nei M, y Kumar S (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030–11035.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.

Tibayrenc M, Le Ray D (1984). General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and comparison with *T. (S) C. Marinkeilli* and *T* (herpetosoma) *Rangeli*. *Ann Soc Belg Med Trop.* 64:239–48.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease; have a complex multiclonal structure. *Proc Nat Ac Sc* 83:115–119.

Tibayrenc M, Ayala F (1988). Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetic, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution* 42:277–292.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Breniere SF, Dardé ML, Ayala FJ (1991). Are microorganism clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci* 88:5129–5133.

Tibayrenc M (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other Microorganisms. *Adv Parasitol* 36:48–115.

Tibayrenc M (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2:12

Thompson JD, Higgins DG, y Gibson TJ (1990). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83:141–152.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D Ávila, RD, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Moreira MCV, Brasileiro Filho G, Pena DJS (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic chagas disease differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156:1805–1809.

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171:527–543.

Westenberger, S.J., Sturm, N.R., Campbell, D.A (2006). *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol* 36: 337–346

WHO (2002). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Geneva, Switzerland: UNDP/World Bank/WHO. Technical Report Series 905.

WHO (2007). Special programme for research and training in tropical diseases (TDR). Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina 17–20 April 2005. Update July 2007.

Zhou C, Yang Y, Jong AY. Mini prep in ten minutes. *Biotechniques* V8, n2. P 172-173. 1990.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz 94:159–164.

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

Anexo A

Paso	Tiempo	°C
1	5 min	95
2	1 min	94
3	1 min	70
4	1 min	72
5	Cuatro veces al paso 2	
6	1 min	94
7	1 min	68
8	1 min	72
9	Cuatro veces al paso 6	
10	1 min	94
11	1 min	65
12	1 min	72
13	Cuatro veces al paso 10	
14	1 min	94
15	1 min	60
16	1 min	72
17	Cuatro veces al paso 14	
18	1 min	94
19	1 min	59
20	1 min	72
21	Dos veces al paso 18	
22	1 min	94
23	1 min	58
24	1 min	72
25	Dos veces al paso 22	
26	1 min	94
27	1 min	57
28	1 min	72
29	Ocho veces al paso 26	

Tabla 1. Programa de amplificación por PCR del gen rRNA 5.8S e ITS 1 y 2.

Anexo B

Secuencia	Acceso Genbank	Origen	Huésped	DTU
D12	GU991786	Col (Tolima)	<i>Didelphis marsupialis</i>	nd
SN8	GU991794	Col (Magdalena)	<i>Rhodnius prolixus</i>	nd
SEV	GU991793	Col (Boyacá)	Humano	nd
Td11	GU991797	Col (Tolima)	<i>Triatoma dimidiata</i>	nd
EM	GU991791	Col (Caquetá)	Humano	nd
Caquetá	GU991790	Col (Caquetá)	Humano	nd
SP	GU991799	Col (Casanare)	Humano	nd
Rp523	GU991796	Col (Casanare)	<i>Rhodnius prolixus</i>	nd
Rb2	AF362822	Brasil (Amazonas)	<i>Rhodnius brethesi</i>	DTU I
AM16/95	AF362824	Brasil (Amazonas)	Humano	DTU I
SE	AF362825	Brasil (Amazonas)	Humano	DTU I
1523	AF362826	Brasil (Amazonas)	Humano	DTU I
Rb1	AF362821	Brasil (amazonas)	<i>Rhodnius brethesi</i>	DTU I
Rb8	AF362823	Brasil (Amazonas)	<i>Rhodnius brethesi</i>	DTU I
G118	AF362830	Brasil Rio de Janeiro	<i>D. marsupialis</i>	DTU I
Esmeraldo	AF362827	Brasil Río de Janeiro	<i>Holochylus brasiliensis</i>	DTU II
AM11	AF362832	Brasil Río de Janeiro	<i>Trypanosoma rangeli</i>	

Anexo C: Alineamiento con el programa Clustal W, de 6 de los clones aislados del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, de *T. cruzi* | cepa Sylvio X10 (ATCC 50823). El clon 9b fue excluido del alineamiento por ser demasiado corto. AF362825.1, secuencia homóloga en *Trypanosoma cruzi* | aislado SE (Santos et al., 2002). Los sitios de restricción *RsaI*, *BstUI*, *HaeIII* y *TaqI* se resaltan en amarillo. El gen rRNA 5.8S está resaltado en gris.

```

6 -----
8 TTCCGGATGATTT--GTTACAATTAT---TATTTAAATTACCGGGTGGGTGTGTATAAAT 55
11 TTCCGGATGATTTCTGTTACA-ATA----TATAATA---ACGGGTGGGGTG-GTATAATA 51
20 TTCCG-ATGATTTCTGTTACATATA----TATA-----TAC-GGTTGTGTGTGTATAAATA 49
1c TTCCG-ATGATTT--GTTACAATAATAATAAAGGTAATAC-GGGTGGGGGGTATAATA 56
8b TTCCGGATGATTTCTGTTAC-CATA-----ATAATA-ATACGGGTGGGGTGTGTATAAATA 53
AF362825.1 TTCCG-ATGATTTCTGTTACATATA----TATAATATATAC-GGTTGTGTGTGTATAAATA 54

```

RsaI

```

6 -----
8 TATGTTGTAC-ACACCAATTCAGGCAACAAAACCTCTGGGCG-TGTATATATATTACTAC 113
11 TATGTTGTAC-ACACACAATTAAGGCAACAAAATCTGG-CGGTGTGTATATATTACTAC 109
20 TATGTTGTAC-ACACACAATC-AGGCAACAAAACCTCTGG-CG-TGTGTATATATTACTAC 105
1c TATGTTGTAC-ACACCAATCCAGGCAACAAAACCTCTGG-CGGTGTATATATATTACTAC 114
8b TATGTTGTCCACAC-CAATC-AGGCAACAAAACCTCTGG-CG-TGTGTATATATTACTAC 109
AF362825.1 TATGTTGTAC-ACACACAATC-AGGCAACAAAACCTCTGG-CG-TGTATATATATTACTAC 110

```

BstUI

```

6 -----
8 TATGCTACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGT-GTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 172
11 TGTGCTACTAATATATATACTCTGTGCAGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 169
20 TGTGCTACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 165
1c TATGCTACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGT-GTTGTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 173
8b TGTGCTACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 169
AF362825.1 TATGCTACTAATATATATACTCTGTGCTGTGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGC CGCGCGGGAGAGGA 170

```

RsaI

RsaI

```

6 -----
8 TATATACATGTGTACACGCTATTATTATATATATATATATATATAGTATATATATATGTG 232
11 TATATACATGTGTACACGCTATTATTATGTAC---TATATATAGTATATATATATATGTG 226
20 TATATACATGTGTACACGCTATTATTATATA----TATATATAGTATATATATATATGTG 221
1c TATATACATGTGTACACGCTATTATTATATA----TATATATAGTATATATATATATGTG 229
8b TATATACATGTGTACACGCTATTATTATGTAC---TATATATAGTATATATATATATGTG 226
AF362825.1 TATATACATGTGTACACGCTATTATTATGTGC---TATATATAGTATATATATATAT--GTG 225

```

RsaI

```

6 -----
8 TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTAT 41
8 TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTAT 292
11 TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTAT 286
20 TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTAT 281
1c TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTAT 289
8b TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCGCTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTAT 286
AF362825.1 TGTGTGCTGTGCTGTGCTTCTCTTCGCACTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTAT 285

```

*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

6 ATAATGTATCTAATATATAATATACACTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 101
8 ATAATGTATATAATATATAATATACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 352
11 ATAATGTATATAATATATAATATACACTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 346
20 ATAATGTATATAATATATAATATACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 341
1c ATAATGTATATAATATATAATATACGCTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 349
8b ATAATGTATATAATATATAATATACACTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 346
AF362825.1 ATAATGTATATAATATATAATATACACTTGCACGCGTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGA 345

```

***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

BstUI

```

6 AAAATG-TAATTGCGGCTTGACTT CGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGT 159
8 AAAATG-TAATTGCGGCTTGACTT CGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGT 410
11 AAAATG-TAATTGCGGCTTGACTT CGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGT 404
20 AAAATG-TAATTGCGGCTTGACTT CGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGT 399

```


RsaI

6 CACCGCCATGTGCGTATATAT----ATATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 628
 8 CGCCGCCATGTGCGTATATAT----ATATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 875
 11 CGCCGCCATGTGCGTATATAT----ATATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 867
 20 CGCCGCCATGTGCGTATATAT----ATATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 865
 1c CGCCGCCATGTGCGTATATAT-----ATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 869
 8b CGCCGCCATGTGCGTATATAT----ATATATATTATTTATATATTATAT----GTGTACG 874
 AF362825.1 CGCCGCCATGTGCGTATATATGTGTATATATATTATTTATATATTATATATGTGTACG 876
 * *****

6 TGC GTGTGTCTTCTGGTGGTGGTGCATGATCCGCCCCGGCGCTTGTGTATGTGTTT 688
 8 TGC GTGTGTCTTCTGGTGGTGGTGCATGATCCGCCCCGGTGTCTTGTGTGCGTGT 935
 11 TGC GTGTGTCTTCTGGTGGTGGTGCATGATCCGCCCCGGCGCTTGTGTGTGTTT 927
 20 TGC GTGTGTG----- 875
 1c TGC GTGTGTCTTCTGGTGGTGGTGCATGATCCGCCCCGGCGCTTGTGTGTGTT 927
 8b TGC GTGTGTCTTCTGGTGGTGGTGCATGATCCGCCCCGGCGCTTGTGTGTGTTT 934
 AF362825.1 TGC GTGTGTGCT---GGTGTGTGGTGCATGATCCGCCCCGGCGCTTGTGTGTGTTT 933

RsaI

6 GTACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTATTGTGTGT---GTGTGTGCAACACAACA 745
 8 GTACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTATTGTGTGT---GTGTGTGCAACACAACA 992
 11 GTACACATAACATATGTGCGTCTCTGTGTATTGTGTGT---GTGTGTGCAACACAACA 984
 20 -----
 1c GTACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTATTGTGTGT---GTGTGTGCAACACAACA 984
 8b GTACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTATTGTGTGT---GTGTGTGCAACACAACA 991
 AF362825.1 GTACACATAACATATGTGCATCTCTGTGTATTGTGTATTGTGTGTGCAACACAACA 993

6 ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGC 805
 8 ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGT 1052
 11 ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGC 1044
 20 -----
 1c ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGC 1044
 8b ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGC 1051
 AF362825.1 ACAACACAAAAC TACAAAAC TCGCAAGAGAT TAAAAAGAATAAAAAAGAAAAAAGTGGC 1053

6 GTGGGGGTGTGGTGTGGTGTG---GTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 862
 8 GTGGGGGTGCGGTGTGGTGTG---GTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 1109
 11 GTGGGGGTGTGGTGTGGTGTG---GTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 1101
 20 -----
 1c GTGGGGGTGTGGTGTGGTGTG---GTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 1101
 8b GTGGGGGTGTGGTGTGGTGTG---GTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 1108
 AF362825.1 GTGGGGGTGTGGTGTGTTGTGTGTGTGTGTGTATGGTGTGCGGTGTGTTCCACCATA 1113

6 TCACACATATCATAACAATATATATATATACACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTCTT-A 921
 8 TCACACATATCATAACAATATATATATATACACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTTTTC 1169
 11 TCACACATATCATAACAATATATATATATACACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTTTT-C 1160
 20 -----
 1c TCACACATATCATAACAATATATATATATACACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTTTT 1160
 8b TCACACATATCATAACAATATATATATATACACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTTTAAA 1168
 AF362825.1 TCACACATATCATAACAATATATATAT--CACGTAACGCTACGCTTATTTTTTTTTT-C 1170

6 TTATTC TTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 965
 8 TTCTTC TTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 1213
 11 TTCTTC TTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 1204
 20 -----
 1c TTCTTC TTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 1204
 8b TTGTTCTTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 1212
 AF362825.1 TTCTTC TTTTTGTTTACAGACCTGAGTGTGGCAGGACTACCCGC 1214

Anexo D: Alineamiento con el programa ClustalW, de la región común de 632 pb de los 6 clones aislados del fragmento ITS1—rRNA 5.8S—ITS2, de *T. cruzi* | cepa Sylvio X10 (ATCC 50823). El clon 9b fue excluido del alineamiento por ser demasiado corto. AF362825.1, secuencia homóloga en *Trypanosoma cruzi* | aislado SE (Santos et al., 2002). El gen rRNA 5.8S está resaltado en gris.

```

6          TTCGCACTGATACATATTTCCACACTGTACGTGTATATAATGTATCTAATATATAATAT 60
8b         TTCGCGCTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
8          TTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
11         TTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
20         TTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
1c         TTCGCACTGATACATATATCCCACACCGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
AF362825.1 TTCGCACTGATACATATATCCCACACTGTACGTGTATATAATGTATATAATATATAATAT 60
          *****

```

```

6          ACACTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
8b         ACACTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAAAGGTAATTGCGGCTTGACT 120
8          ACGCTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
11         ACGCTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
20         ACGCTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
1c         ACGCTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
AF362825.1 ACACTTGACACGCTTACGAGTGTGTTGGATGTGTAGAAAAATG-TAATTGCGGCTTGACT 119
          ** *****

```

```

6          TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTTTATATATATATATA 178
8b         TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTATATATATATATATA 179
8          TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTTTATATATATATATA 178
11         TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTTTATATATATATATA 178
20         TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTTTATATATATATATA 178
1c         TCGCGTGTGCACATA-TATAATATGCGCATATTTTCGTCGTGTGGTTTATATATATATATA 178
AF362825.1 TCGCGTGTGCACATAATATAATATGCGCATATTTTCGTCGNGTGGGTTATATATATATATA 179
          *****

```

```

6          TATATATTCGCGACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 238
8b         TATATATTCGCGACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 239
8          TATA--TTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 236
11         TATA--TTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 236
20         TA----TTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 234
1c         T-----TCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 232
AF362825.1 TTTA--TTCCGCACGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTGTGCGCCGCGTTGTAAGCACGG 237
          * *****

```

```

6          CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 298
8b         CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGGCTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 299
8          CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 296
11         CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 296
20         CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 294
1c         CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA 292
AF362825.1 CCCAAACACGTTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGNTGAAGAACGCAGCAAA 297
          *****

```

```

6          GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 357

```

```

8b      GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 358
8       GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 355
11      GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 355
20      GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 353
1c      GTGCGATAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 351
AF362825.1 GNGCGATAAGGNGGNATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACG 357
* ***** ** *****

6       GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 417
8b      GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 418
8       GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 415
11      GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 415
20      GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 413
1c      GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCGTGCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 411
AF362825.1 GCGCATGGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-GCATGCCATATTTCTCAGTGTGCGAAC 415
***** *****

6       AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 477
8b      AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 478
8       AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 475
11      AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 475
20      AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 473
1c      AAAAAATTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 471
AF362825.1 AAAAA-TTAACCTCCACTCACACTGCTCTCTCTCTATACAAACGCATGCATTCTTGTGTG 474
***** *****

6       TGTGTGTGT--GGGGAGAGAGGGGAGGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 535
8b      TGTGTGTGT--GGGGAGAGAGGGGAGGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 536
8       TGTGTGTG---GGGAGAGAGGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 531
11      TGTGTGTG---GGGAGAGAGGGGAGGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 531
20      TGTGTGTGTGTGGGGAGAGAGGG-AGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 532
1c      TGTGTGTGTGTGGGGAGAGAGGG-AGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 530
AF362825.1 TGTGTGTGT--GGGAANAGAGGA-AGGGAGGGGGAAAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCC 531
***** ** * *****

6       CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 593
8b      CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 594
8       CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 589
11      CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 589
20      CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 590
1c      CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGTAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATAT-- 588
AF362825.1 CTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGCGCCGCCGCCGCCCATGTGCGTATATATGT 591
***** *****

6       --ATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGC----- 627
8b      --ATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTG----- 627
8       --ATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGT----- 627
11      --ATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGT----- 627
20      --ATATATATTATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGTGTG-- 631
1c      --ATATAT--TATTTATATATTATATGTGTACGTGCGTGTGTGTC 629
AF362825.1 GTATATATATTATTTATATATTATATATATATGTGTACGTGC----- 631
***** *****

```

Anexo E: Alineamiento con el programa ClustalW, de la región ITS2 de los 6 clones aislados de *T. cruzi* I cepa Sylvio X10, ATCC 50823, con la misma región de cepas colombianas y brasileñas. El clon número 20 fue excluido por carecer de la región ITS2.

```

AM11      ----ACAAAAA---ACCCGCACATGNGGGGGACCATTGGGTTATGGATATATATATAT 53
Esmeraldo ----AAAAAATTAACCC-CTACTC-----TACAA 24
Rb2       ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
AM16/95   ----AAAAATTAACNTCCACTCACCNTGCTCTC-----TNTNATACAA 41
Rb1       ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
SE        --CGAACAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 45
1523      ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
G118      ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACANTGCTCTC-----TNTCTATACAA 41
R6        ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACA-TGTTTTC-----TTNATACAA 40
Rb8       ----AAAAAATTANCC-----NTAC-----TTTTATGCCAA 28
SN8       ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
SEV       ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 40
Td11      ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 40
D12       ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
EM        ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
Caquetá   ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
SP        ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
Rp523     ----AAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 41
6         TCGAACAAAAAATTAACCT-CCACTCAGCTGCTCTC-----TCTCTATACAA 47
8         -CGAACAAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 46
11        TCGAACAAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 47
1c        TCGAACAAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 47
8b        TCGAACAAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 47
9b        ----ACAAAAAATTAACCT-CCACTCACACTGCTCTC-----TCTCTATACAA 43
          **** * * * *

```

```

AM11      ATATATCGGCATCTACGTTTTGTGCACGCTGTGCTGTTTTGTGGAAATGTGTATATAT 113
Esmeraldo -CGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGT-----GGGT 56
Rb2       ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGT---GGGANAGAG-GGG-GGGA 85
AM16/95   ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-AGA-GGG 81
Rb1       ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 82
SE        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGT---GGGANAGA-GGAAGGGA 90
1523      ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTGTTGGGAAAAA-AGA-GGGA 87
G118      ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTGTTGGGAAAAAG-GA-AGGA 86
R6        ACGCAT--GCATTN---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGAAANAG-GGA---GG 78
Rb8       -CGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGT-----GNN 58
SN8       ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 82
SEV       ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 81
Td11      ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 81
D12       ACGCAT--GCATTC---CTGTG---TGTGT-GTGTG---GGGAGAGAG-GGA-GGG 83
EM        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 82
Caquetá   ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGA-GGGA 82
SP        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTG-----GGGAGAGAG-GGAAGGGA 83
Rp523     ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-AGA-GGGA 86
6         ACGCAT--GCATTC---TTGCG---TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-GGGAGGGA 93
8         ACGCAT--GCATTC---TTG-----TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-GGGAGGGA 90
11        ACGCAT--GCATTC---TTG-----TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-GGGAGGGA 91
1c        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTG---TGGGAGAGAGGGAGGGA 94
8b        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-GGGAGGGA 93
9b        ACGCAT--GCATTC---TTGTG---TGTGT-GTGTGTG---GGGAGAGAG-GGGAGGGA 89
          ** **** * * * *

```

```

AM11      GTATATATATGCACATGC----AGAGAGCCCTGGGGA-----TTACGGATGAAGC 160
Esmeraldo GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGA---CATTACGGATGAAGC 112
Rb2       GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 145
AM16/95   AGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 141
Rb1       GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 142
SE        GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 150
1523      GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 147
G118      AGGGGAAATGCAA-CNCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGAAAAACATATTNGGAATAAAGC 144
R6        AGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGNAGAGACATATTACGGATGAAGC 138
Rb8       AGGGGAAATG- AAACGCAAAAAAGAGAGCC-TGGGNAGA---CATTACGGATGAAGC 112
SN8       GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 142
SEV       GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 141
Td11      GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 141
D12       AGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 143
EM        GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 142
Caquetá   GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 142
SP        GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 143
Rp523     GGGGGGAAATGCAAACGCAAAAAAGAGAGCCCTTGGGGAGAGACATATTACGGATGAAGC 146

```


Rb8 AAAAAA--GTGGCGTGGGG-----GTGTG-----TGTGT----- 342
 SN8 AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 419
 SEV AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 418
 Td11 AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 411
 D12 AAAAAA--GTGGCGTGGAG--GTGTGGTGTG-----GTGTT-----GTGTGT---GTG 417
 EM AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 419
 Caquetá AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 419
 SP AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGT-----GTGTGT---GTG 424
 Rp523 AAAAAA--GTGGCGTGGGT--GTGTGGTGTGGTGTGGTGT-----GTGTGT---GTG 427
 6 AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG-----GTGTG-----GTGTGT----- 417
 8 AAAAAA--GTGGTGTGGGG--GTGCGTGTG-----GTGTG-----GTGTGT----- 414
 11 AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---GTGTG-----GTGTGT----- 415
 1c AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---GTGTG-----GTGTGT----- 414
 8b AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---GTGTG-----GTGTGT----- 417
 9b AAAAAA--GTGGCGTGGGG--GTGTGGTGTG---TGGTGTGGTGTGT----- 419
 *** **** * * *****

AM11 AAAGAGAGAGAAGGGGGTTGGGGGGGAGGTTGTGTGTGGTTTTTTGGTGGTGGG 516
 Esmeraldo -----GGGGC---GGGGCG-GGGCATGCATA----TACACA--ACACC 433
 Rb2 T-----TGTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 451
 AM16/95 TGT-----TGTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 453
 Rb1 TGT-----TGTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 454
 SE TG-----TGTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 457
 1523 T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 443
 G118 T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 449
 R6 T-----GT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATAT- 444
 Rb8 -----GGTGT---GTGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--ACACC 374
 SN8 T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATC 454
 SEV T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATC 453
 Td11 T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATA 446
 D12 TGT-----TGTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 453
 EM T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATC 454
 Caquetá T-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATC 454
 SP T-----GT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCACCATATC 457
 Rp523 TT-----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 461
 6 -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 449
 8 -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 446
 11 -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 447
 1c -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 446
 8b -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 449
 9b -----GTGT---ATGGTGTGGCGTGTG-----TCCAC--CATATC 451
 ** * ** *

AM11 AGGAAAAAGAGAGAGACACCGTGCA-ACAACAACAACTA--AAATCTCACAAGAGA- 572
 Esmeraldo A-----CACGCACACACACATGTGTAGTAGTATATACAAATGTAATAT 477
 Rb2 A-----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 485
 AM16/95 A-----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 487
 Rb1 A-----CACATAT-CATACATATATAT-----ATATATCAGTAAAC 491
 SE A-----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 491
 1523 A-----CACATAT-CCTACAA-TATAT-----ATAT--CACGTAAC 477
 G118 A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 485
 R6 -----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 477
 Rb8 AT-----CACATAT-AATATAC-----ACATGTC----- 397
 SN8 A-----CACATAT-CATACA--TATAT-----ATATATCAGTAAAC 489
 SEV A-----CACATAT-CATACA--TATAT-----ATATATCAGTAAAC 488
 Td11 T-----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 480
 D12 A-----CACATAT-CATACA---ATATT-----ATATATCAGTAAAC 488
 EM A-----CACATAT-CATACA--TATAT-----ATATATCAGTAAAC 489
 Caquetá A-----CACATAT-CATACA--TATAT-----ATATATCAGTAAAC 489
 SP T-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 493
 Rp523 A-----CACATAT-CATACA---ATAT-----ATATATCAGTAAAC 495
 6 A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 485
 8 A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 482
 11 A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 483
 1c A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 482
 8b A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 485
 9b A-----CACATAT-CATACAA-TATAT-----ATATATCAGTAAAC 487
 *** ** *

AM11 GACTACAAAAAATAATATTTTT---TTTTC-----TTGTTTGTTTACAGACCT 622
 Esmeraldo ATATATATA-----TATATATATGCATGTACATTATACAATATATATATATGAT 527
 Rb2 GTCTACGCT-----TATTTTT---T-TTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 528
 AM16/95 GTCTACGCT-----TATTTTT---TTTTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 524
 Rb1 GTCTACGCT-----TATTTTT---TTTTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 531
 SE GTCTACGCT-----TATTTTT---TTTTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 535
 1523 GTCTACGCT-----TATTTTT---TTT-C-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 516
 G118 GTCTACGCT-----TATTTTT---TTTTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 522

```

R6      GTCTACGCT-----CATTTT-----TTTC-TTCTTCTTTTGTGTTA----- 514
Rb8     -TCTACGCT-----TATTTT-----TTTC-TTCTTCTTTTGTGTTACAGACCT 440
SN8     GTCTACGCT-----TATTTT-----TTCTC-----TC----- 512
SEV     GTCTACGCT-----TATTTT-----TTCT-----CTCTTTA----- 516
Td11    GTCTACGCT-----TATTTT-----T-CTC-----TCTTTGTA----- 508
D12     GTCTACGCT-----TATTTT-----TTTC-TTCTTCTTTTGTGTTACAGACCT 532
EM      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTCT-----CTCTTTGGGTTAA----- 524
Caquetá GTCTACGCT-----TAT----- 501
SP      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTCTC-----TCTTTGTA----- 522
Rp523   GTCTACGCT-----TATTTT-----T-CTC-----TCTTTGTAA----- 524
6       GTCTACGCT-----TATTTT-----TCTTA-TTATTCTTTTGTGTTACAGACCT 529
8       GTCTACGCT-----TATTTT-----TTTTCTTCTTCTTTTGTGTTACAGACCT 527
11      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTT-CTTCTTCTTTTGTGTTACAGACCT 527
1c      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTTC-TTCTTCTTTTGTGTTACAGACCT 526
8b      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTTAAATTGTTCTTTTGTGTTACAGACCT 530
9b      GTCTACGCT-----TATTTT-----TTTC-TTTTCTTTTGTGTTACAGACCT 531
      **                **

```

```

AM11    GAGTGTG-CAGGACTACCCGC----- 642

Esmeraldo AATG----- 531
Rb2      GAGTG----- 533
AM16/95  -----
Rb1      -----
SE       GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 556
1523    -----
G118    -----
R6       -----
Rb8     GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 461
SN8     -----
SEV     -----
Td11    -----
D12     GAGTGTGGCAGGACTACCCACA 558
EM      -----
Caquetá -----
SP      -----
Rp523   -----
6       GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 550
8       GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 548
11      GAGTGTGGCAGGACTAC----- 544
1c      GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 547
8b      GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 551
9b      GAGTGTGGCAGGACTACCCGC----- 552

```

Anexo F: Alineamiento con el programa ClustalW, del gen rRNA 5.8S de los 6 clones aislados de *T. cruzi* I cepa Sylvio X10, ATCC 50823, con la misma región de cepas colombianas y brasileñas. En amarillo se resaltan nucleótidos polimórficos de cada secuencia.

```

AM11      AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCA-CAAAGTG-CGA 58
1523     AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCT-CCTANTTCGTTGAAACACGCAGCAAAGT--CGA 57
20       AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
1c       AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
11       AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
6        AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
8        AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
8b       AACGTGTCGCGATGGATGGCTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
SE       AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGNTGAAGAACGCAGCAAAGNG-CGA 59
994     AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
5894    AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
Esmeraldo AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTG-CGA 59
G118    AACGTGTCGNNAAAGGATNN-TTGGCTTCCTATTTTCGNTGAAGAACGCANCAAAGTN-CGA 58
rb1     AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGNTGAAGAACGC-CAAAGNGCGA 59
rb2     AACGTGTCGCGATGGATGACTTG-CTTNCTATTTTCGNTGAAGAACGCANCAAAGG--CGA 57
R6      AACGTGTCGCGATGGATGACTTG-CTTNCTATTTTCG-TGAAGAACGCANAAAGT--CGA 56
AM16/95 AACNGTNNCGATGGATGACTTG-CTTNCTATTTNNNGAANAACGCANCAAANNNG-CGA 58
          **** *  * ****  *** *  ** *  *  * *****  ***  ***

AM11      TAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
1523     CAA-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAA-ACGGCGCAT 115
20       TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
1c       TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
11       TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
6        TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
8        TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
8b       TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
SE       TAAGNGGNATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 119
994     TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
5894    TAAG-TGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
Esmeraldo TAAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 119
G118    TAAG-TGGTATCAAT-GCAGANTCATTTCAATTACCGAATNTTTGAACGCAAACGGCGCAT 116
rb1     TAAG-NGGNATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 118
rb2     TAGG-TGG-ATCAATTGCAGAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 115
R6      TAAG--GGTANCAATTGCANAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAT 114
AM16/95 TAAG-NGGGATCNATTGCAGAATCATTTCAATN-CNNAATCTTTGAACGCAAACGGGGCAT 116
          *  ** * * ** * ***** *  *** ***** *  **  **

AM11      GGGAGAAGCTCTTTCGAGGCATNCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 172
1523     GG-AGAAGCTCNTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 168
20       GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
1c       GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
11       GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
6        GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
8        GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGT----- 167
8b       GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
SE       GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG--GCATGCCA-TATTTCTCAGTG----- 166
994     GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 172
5894    GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 172
Esmeraldo GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 173
G118    GG-AGAAGCTCCTCAGAGTCATCCNG--GCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 168
rb1     GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 172
rb2     GGGAGAAGCTCCTCAGAGTCATCCCCG-TGCATGCCA-TATTTCTCAGTGTGCGAAC 169
R6      GGNANAAGCTCCTNANAGTCATCCCCGGTGCATGCCA-TTTTNTCAGTGTNGAAC 169
AM16/95 GG-AAAAGCTCCTNANAGTCATCCNG-TGCANNCCNATA TTTTNTCAGTGTNGAAC 170
          ** * ***** *  ** * ** *  ** *  *  * *****

```