

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi* EN TEJIDOS

GERMAN ALEXIS ZAFRA SIERRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2008

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi* EN TEJIDOS

GERMAN ALEXIS ZAFRA SIERRA

**Trabajo de grado presentado para optar al título de:
*Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas***

**Directora
Clara Isabel González Rugeles, Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2008

*A Dios todopoderoso,
por permitirme alcanzar este gran objetivo*

*A mis padres, Juan y Marlene, por haberme educado,
amado y dado todo para ser quien soy hoy, y así mismo a
toda mi familia que siempre me han apoyado*

*A Claudia, por su apoyo fundamental y comprensión pero
sobretudo por brindarme su amor, motor de mi alma*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora y jefe, doctora Clara Isabel González, por todas las oportunidades, enseñanzas, dedicación y paciencia, esenciales para el desarrollo de este trabajo y para mi formación científica y académica.

A la doctora Andréa Macedo, quien amablemente me recibió en el Laboratorio de Genética y Bioquímica (LGB) de la Universidad Federal de Minas Gerais y cuya ayuda fue incalculable. También a Helder Magno Valadares y a todos los integrantes del LGB en Brasil, por su ayuda y asesoría.

Al doctor Julio Cesar Mantilla, por toda su ayuda y la realización de todos los análisis histopatológicos.

A la doctora Carmen Cecilia Cabrales por su constante colaboración, pero sobretodo por su muy valiosa amistad.

Al Instituto Colombiano de Medicina Legal y Ciencias Forenses, por el aporte de gran parte de las muestras de tejidos utilizados en el estudio.

A COLCIENCIAS, por la financiación de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a Carlos Arturo Sánchez, por la invaluable ayuda ofrecida durante este tiempo, sin la cual probablemente no habría podido realizar mis estudios de maestría.

A todos mis amigos y compañeros de maestría, así como del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	2
1.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	2
1.1.1 Generalidades	2
1.1.2 Mecanismos de transmisión	5
1.1.3 Fases y formas clínicas	7
1.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	9
1.2.1 Ciclo de vida	9
1.2.2 Caracterización biológica	10
1.2.3 Caracterización bioquímica	11
1.2.4 Caracterización genética	12

1.2.5	Clasificación actual de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.2.6	Variabilidad de cepas colombianas de <i>T. cruzi</i>	18
1.3	GENOMA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	20
1.3.1	Genoma nuclear	20
1.3.2	Genoma mitocondrial	22
1.4	PAPEL DEL PARÁSITO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	25
1.4.1	Modelo histotrópico clonal	25
1.5	PAPEL DEL HOSPEDERO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	29
2.	JUSTIFICACIÓN	31
3.	OBJETIVOS	33
4.	METODOLOGÍA	34
4.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO	34
4.1.1	Tejidos humanos	34
4.1.2	Parásitos control	34

4.1.3 Muestras de DNA humano	36
4.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDOS	36
4.2.1 Extracción de DNA	36
4.2.2 Análisis histopatológico de tejidos	37
4.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	38
4.3.1 Amplificación de las regiones hipervariables del kDNA de <i>T. cruzi</i>	38
4.3.2 Detección de <i>T. cruzi</i> por amplificación del nDNA	38
4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	39
4.4.1 Amplificación de la región 3' del RNA ribosomal 24S α	39
4.4.2 Amplificación del gen del RNA ribosomal 18S	40
4.4.3 Amplificación del espaciador no transcrito de los genes del mini-exon	41
4.4.4 Polimorfismo en el gen Citocromo Oxidasa II (<i>COII</i>) del DNA mitocondrial	41
4.4.5 Amplificación de loci de microsatélites	43
4.4.6 Obtención de perfiles de kDNA por LSSP-PCR	45

4.4.7 Secuenciación de DNA de <i>T. cruzi</i> a partir de tejidos	46
4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS	46
4.5.1 Clasificación molecular de <i>T. cruzi</i>	46
4.5.2 Análisis de los perfiles de kDNA por LSSP-PCR	48
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	49
5. RESULTADOS	50
5.1 DETECCIÓN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EN TEJIDOS DE PACIENTES	50
5.1.1 Detección del DNA de <i>T. cruzi</i>	50
5.1.2 Análisis histológico de los tejidos	50
5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	54
5.2.1 Caracterización de los genes del rRNA 24S, rRNA 18S y mini-exon	54
5.2.2 Análisis del polimorfismo del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa II	56
5.2.3 Amplificación de microsatélites polimórficos	58
5.2.4 Perfiles de kDNA por LSSP-PCR y LSSP-PCR fluorescente	63

5.2.5 Análisis de perfiles de kDNA y relación con hallazgos patológicos	67
5.2.6 Análisis de secuencias de DNA	72
6. DISCUSIÓN	74
7. CONCLUSIONES	87
8. RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	111

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Muestras de tejidos estudiadas y características patológicas asociadas.	35
Tabla 2. Parásitos utilizados como controles en este estudio.	36
Tabla 3. Clasificación clínica de pacientes chagásicos cuyo DNA fue utilizado como control en los ensayos de LSSP-PCR.	37
Tabla 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de los microsatélites.	44
Tabla 5. Identificación de los distintos linajes y sublinajes de <i>T. cruzi</i> .	47
Tabla 6. Detección por PCR del nDNA y kDNA de <i>T. cruzi</i> en los tejidos de pacientes.	51
Tabla 7. Hallazgos histológicos en tejidos infectados con <i>T. cruzi</i> .	52
Tabla 8. Caracterización genética de cepas de referencia y aislados de <i>T. cruzi</i> .	54
Tabla 9. Caracterización genética de <i>T. cruzi</i> presente en tejidos de	55

pacientes chagásicos.

Tabla 10. Caracterización genética de <i>T. cruzi</i> presente en sangre periférica de pacientes chagásicos en diferentes estadios.	56
Tabla 11. Tipificación por microsatélites de cepas y aislados de <i>T. cruzi</i> .	59
Tabla 12. Tipificación por microsatélites de <i>T. cruzi</i> en tejidos de pacientes chagásicos.	59
Tabla 13. Análisis de los perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de los tejidos, sangre periférica y cepas de <i>T. cruzi</i> mediante DNA-POP.	67
Tabla 14. Análisis de los perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de los tejidos con respecto a la severidad del cuadro histopatológico mediante DNA-POP.	68
Tabla 15. Porcentajes de identidad obtenidos en la comparación de secuencias del gen mini-exon de cepas de <i>T. cruzi</i> con los encontrados en los tejidos.	72

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Países endémicos para la enfermedad de Chagas.	2
Figura 2. Áreas endémicas para enfermedad de Chagas en el departamento de Santander, año 2006.	4
Figura 3. Distribución de los vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> en América latina.	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	10
Figura 5. Representación esquemática del rRNA de <i>T. cruzi</i> .	14
Figura 6. Representación esquemática de la región amplificada por los iniciadores TC, TC1 y TC2 en el espaciador intergénico del mini-exon de <i>T. cruzi</i> .	14
Figura 7. Distribución geográfica de genotipos de <i>T. cruzi</i> involucrados en infecciones humanas.	19
Figura 8. Esquema de una molécula de maxicírculo de <i>T. cruzi</i> .	23
Figura 9. Esquema de una molécula de minicírculo de <i>T. cruzi</i> .	24

Figura 10. Modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas.	27
Figura 11. Identificación de <i>T. cruzi</i> utilizando rRNA 24S α , rRNA 18S y mini-exon.	47
Figura 12. Análisis histológico en tejidos infectados con <i>T. cruzi</i> .	53
Figura 13. Caracterización genética de <i>T. cruzi</i> presente en tejidos de pacientes chagásicos mediante el análisis de los genes del mini-exon, rRNA24S y rRNA 18s.	57
Figura 14. Caracterización de <i>T. cruzi</i> en tejidos de pacientes con cardiomiopatía chagásica, mediante el análisis del gen <i>COII</i> .	58
Figura 15. Electroferogramas del microsatélite TAC15 en cepas de <i>T. cruzi</i> y en tejidos de pacientes chagásicos.	50
Figura 16. Electroferogramas del microsatélite TAT20 en cepas de <i>T. cruzi</i> y en tejidos de pacientes chagásicos.	51
Figura 17. Electroferogramas del microsatélite AAAT6 en cepas de <i>T. cruzi</i> y en tejidos de pacientes chagásicos.	52
Figura 18. Perfiles de LSSP-PCR obtenidos de los tejidos de pacientes con cardiopatía chagásica.	64
Figura 19. Perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes chagásicos en diferentes estadios y parásitos control	65

Figura 20. Electroferogramas de los perfiles de LSSP-PCR fluorescente en cepas y aislados de <i>T. cruzi</i> y tejidos de pacientes chagásicos.	66
Figura 21. Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR en las muestras de tejidos, sangre periférica y parásitos control.	69
Figura 22. Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR en las cepas y aislados de <i>T. cruzi</i> utilizados como control.	70
Figura 23. Dendrograma construido por el método UPGMA basado en las diferencias de los perfiles de LSSP-PCR en las muestras de tejidos, con respecto a la severidad del cuadro histopatológico.	71
Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen mini-exon de <i>T. cruzi</i> presentes en los tejidos infectados, realizado con el programa ClustalW2.	73

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Clasificación clínica y electrocardiográfica de la enfermedad de Chagas en estadios según la OMS-OPS.	111
Anexo B. Resumen de presentación en XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, 2007, Isla Margarita. Venezuela.	112
Anexo C. Resumen de presentación en IX Simposio PECET: Avances en la investigación de enfermedades tropicales, 2008, Medellín.	114

TITULO: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi* EN TEJIDOS*.

AUTORES: ZAFRA SIERRA, German Alexis; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel**.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, tejidos, selección clonal, LSSP-PCR.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad presenta un curso clínico variable, desde formas asintomáticas hasta formas crónicas cardíacas o digestivas, siendo influenciada por factores genéticos tanto del parásito como del hospedero. En este estudio se tipificaron molecularmente las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* detectadas en diferentes tejidos de pacientes chagásicos provenientes del departamento de Santander (Colombia), con el fin de establecer su perfil de variabilidad genética y su posible relación con las manifestaciones histopatológicas de la enfermedad de Chagas.

La tipificación se realizó caracterizando genes nucleares, mitocondriales y por LSSP-PCR. Se detectaron parásitos en 12 tejidos de 45 pacientes, incluyendo corazón y esófago, observándose un predominio del linaje *T. cruzi* I; sin embargo, se demostró por primera vez en Colombia la infección de tejidos con parásitos del linaje *T. cruzi* IIb, asociados con el desarrollo de cardiopatía chagásica. Esto demuestra que los dos linajes principales de *T. cruzi* están implicados en el ciclo de transmisión doméstico en nuestra región y en el país, produciendo cuadros severos de la enfermedad. También se evidenció la presencia de *T. cruzi* en esófago, y aunque no se encontró produciendo un cuadro destructivo severo, podría ser indicativo de la presencia de alteraciones digestivas no detectadas o estudiadas en nuestro país. No se evidenció un tropismo tisular diferencial de los linajes de *T. cruzi* hacia los diferentes tejidos, ni tendencia hacia el desarrollo de una forma clínica en particular. Tampoco se observó una relación entre los perfiles de LSSP-PCR, con la severidad de la patología. Se recomiendan estudios adicionales en vectores, reservorios y pacientes para establecer la frecuencia de *T. cruzi* IIb, así como su papel exacto en el ciclo de transmisión en Colombia y otros países de la región norte de Suramérica y América central.

* Tesis de maestría.

** Facultad de salud. Escuela de medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora de tesis.

TITLE: GENETIC CHARACTERIZATION OF *Trypanosoma cruzi* POPULATIONS IN TISSUE SAMPLES*.

AUTHORS: ZAFRA SIERRA, German Alexis; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel**.

KEY WORDS: Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, tissues, clonal selection, LSSP-PCR.

ABSTRACT:

Chagas' disease is a complex zoonosis, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The disease presents a variable clinical course, ranging from asymptomatic to severe cardiac and/or digestive chronic forms, influenced by both the parasite and host genetic factors. In this work we have typified the *T. cruzi* populations detected in different tissues of chagasic patients from the Santander province of Colombia, in order to establish genetic variability profiles and its possible relationship with the histopathological manifestations of Chagas' disease.

The parasite typification was performed by characterizing nuclear and mitochondrial genes and by LSSP-PCR. *T. cruzi* parasites were detected in 12 tissue samples from 45 patients, including heart and esophagus. The predominant lineage was *T. cruzi* I. However, we demonstrate for the first time in Colombia the infection by *T. cruzi* IIb parasites associated with development of severe chagasic cardiomyopathy. This demonstrates that the two *T. cruzi* main lineages are implicated in the domestic transmission cycle in the country and that both cause severe cases of Chagas' disease. *T. cruzi* parasites were also detected in esophageal tissues. Although, at this location here was not evidence of severe destructive disease, this observation could suggest the presence of digestive forms of Chagas' disease still not detected or not studied in our country. The identified *T. cruzi* lineages did not show any preferential tropism toward different tissues or relationship with a particular clinical or histopathological form of the disease. No association was observed among the LSSP-PCR profiles with the type or severity of the pathology. Based on these findings additional studies are recommended in vectors, reservoirs and patients to establish the frequency of the *T. cruzi* IIb lineage, as well their role in the transmission cycle in Colombia and other countries of the northern region of South America and Central America.

* MSc. Thesis.

** Health Faculty. Medicine School. Biomedics Basic Sciences Master Program. Thesis director.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública en América Latina, en donde se estima que 18 a 20 millones de personas se encuentran infectadas y cerca de 100 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (WHO, 2002). La enfermedad es producida por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos de la familia *Reduviidae*. En Colombia se calcula que existen más de 3 millones de personas expuestas a la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas y se estima que más de 1 millón de personas se encuentran infectadas (Moncayo, 2003). Los departamentos considerados endémicos son Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Arauca, Tolima, Huila y Bolívar (Guhl, 1999).

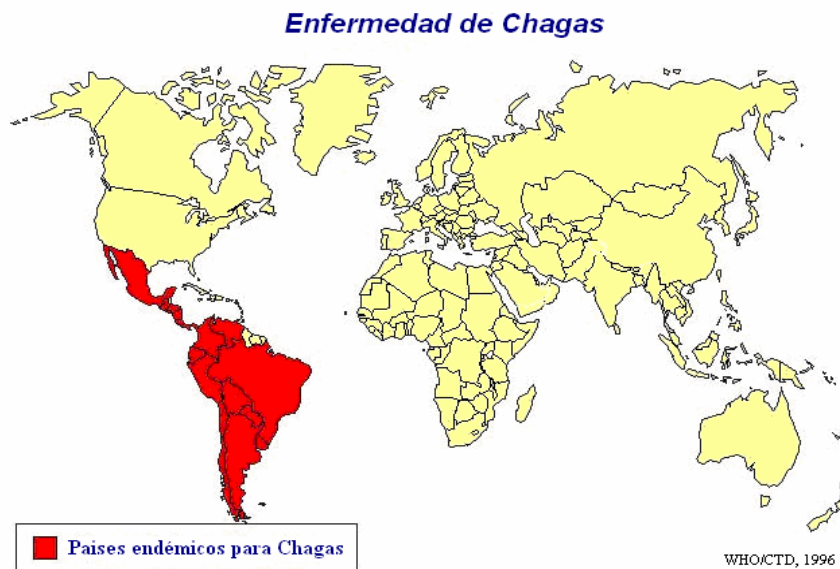
Trypanosoma cruzi exhibe una alta variabilidad genética y biológica evidenciada por la amplia gama de manifestaciones clínicas que se pueden producir en el transcurso de la enfermedad y por los altos niveles de divergencia entre cepas y aislados. Esta variabilidad clínica podría estar determinada en gran medida por la variabilidad genética del parásito (Macedo & Pena, 2004). En Colombia existe un predominio del linaje *T. cruzi* I asociado a la presentación de formas cardiacas de la enfermedad, en contraste con el predominio del linaje *T. cruzi* II en la zona sur de nuestro continente asociado también a mega síndromes digestivos; sin embargo, en nuestro país no existen estudios con tejidos humanos provenientes de pacientes chagásicos para establecer una posible relación entre genotipo y la presentación de una determinada manifestación patológica. Este trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación relacionada con la inmunopatogénesis de enfermedades infecciosas del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) de la Universidad Industrial de Santander, y es la primera aproximación al estudio de los parásitos involucrados en el proceso destructivo e inflamatorio que se desarrolla en los pacientes chagásicos crónicos en Colombia.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.1. Generalidades. La enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud pública en América, encontrándose presente desde la parte sur de Argentina hasta algunas regiones del sur Estados Unidos (Figura 1). Se estima que de 18 a 20 millones de personas se encuentran infectadas y cerca de 100 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (WHO, 2002).

Figura 1. Países endémicos para la enfermedad de Chagas.



Fuente: WHO/CTD, 1996.

La enfermedad fue descrita en 1909 por el Brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), médico que en el curso de una campaña antimalárica en el noreste del estado de Minas Gerais (Brasil) supo por los habitantes de la región,

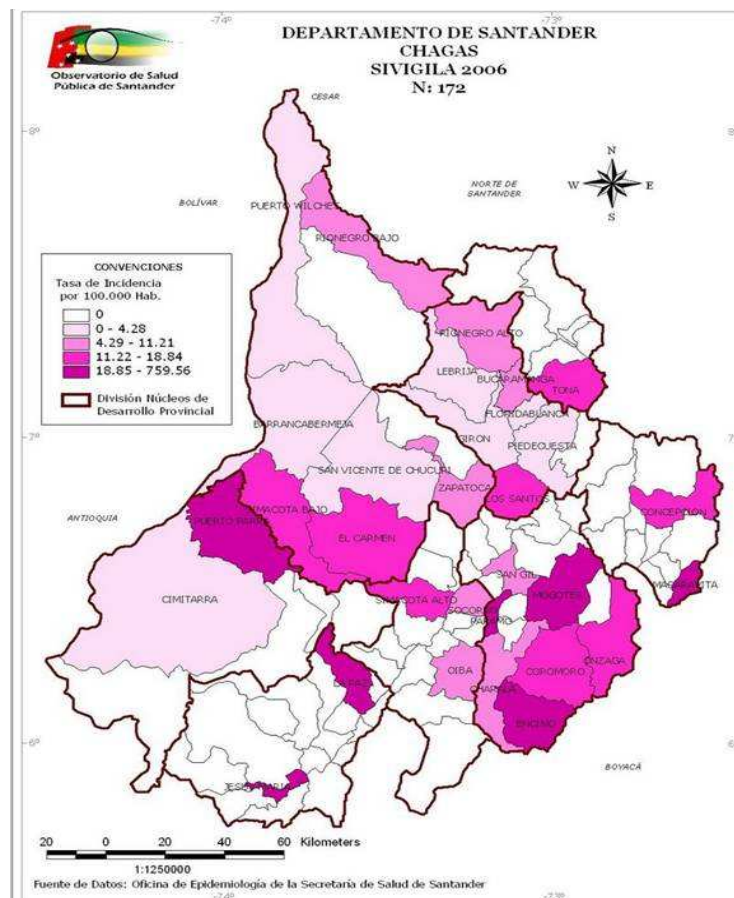
de la existencia de un insecto hematófago llamado "barbeiro", que abundaba en las chozas de barro y paja de la zona y atacaba al hombre en la noche. Chagas capturó y analizó estos insectos y encontró que el intestino posterior estaba poblado de parásitos con caracteres morfológicos parecidos a los parásitos pertenecientes al género *Crithidia*, que supuso eran formas intermediarias de un tripanosoma. Chagas llamó entonces a este microorganismo flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz. Carlos Chagas, Oswaldo Cruz y colaboradores investigaron la epidemiología de la infección en el área, estudiaron el ciclo biológico del parásito en el insecto transmisor y en animales de laboratorio y describieron la enfermedad aguda y crónica, poco después denominada enfermedad de Chagas.

En Colombia, la infección por *T. cruzi* se detecta a todo lo largo del Valle del río Magdalena, en la región del Catatumbo, la sierra nevada de Santa Marta, los llanos orientales y la serranía de la Macarena. Los departamentos considerados endémicos son Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Arauca, Tolima, Huila y Bolivar (Guhl, 1999). Se calcula que existen alrededor de 3.6 millones de personas en Colombia que están expuestas a la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas y se estima que más de 1 millón de personas se encuentran infectadas (Moncayo, 2003).

Estudios serológicos indican que el departamento de Santander es una de las zonas del país más afectadas, y a pesar de las medidas de control vectorial que se han implementado y los diversos trabajos realizados con el propósito de conocer más a fondo aspectos importantes sobre la distribución de vectores, áreas de riesgo y seroprevalencia de la infección (Angulo, 1998 y 1999) la prevalencia de la enfermedad sigue siendo alta (Figura 2). El estudio nacional de seroprevalencia y factores de riesgo de la enfermedad de Chagas realizado en una muestra representativa de la población y las viviendas, encontró una prevalencia de infección chagásica de 35 por 1.000 niños menores de 15 años

principalmente en la región oriental del país, incluyendo Santander (Guhl, 2005). En este departamento las regiones con mayor reporte de casos son las provincias Comunera, Guanentina, de Mares y el área metropolitana de Bucaramanga. Se han encontrado porcentajes de seropositividad superiores al 40% en algunos municipios de las provincias Comunera y Guanentina (Gutierrez *et al.*, 2004). A pesar de la evidente importancia del estudio de la enfermedad de Chagas en Santander, los trabajos realizados con el objetivo de caracterizar bioquímica y genéticamente los parásitos circulantes son pocos y en general es pobre el conocimiento de la epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi* en el departamento de Santander.

Figura 2. Áreas endémicas para enfermedad de Chagas en el departamento de Santander, año 2006



Fuente: Secretaría de Salud de Santander

1.1.2. Mecanismos de transmisión. El mecanismo de transmisión más importante de *T. cruzi* a los humanos y otros mamíferos es a través de las heces de triatomíneos infectados. Los vectores implicados en la transmisión de la enfermedad de Chagas son insectos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*, más conocidos como triatomíneos. De las 118 especies de triatomíneos sólo un número relativamente pequeño representa importancia epidemiológica como vectores de *T. cruzi*. Estas especies colonizan principalmente viviendas rurales, en donde se pueden encontrar colonias de cientos de insectos. Otras especies son habitantes estrictas de diferentes ecótopos silvestres y nunca invaden casas. Las principales especies domiciliadas son responsables de la mayoría de los casos de Chagas humano en áreas endémicas. Estas especies (*Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* *Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius prolixus*) son características de los llamados “espacios abiertos” de Centro y Suramérica (Figura 3). En Santander, los vectores encontrados son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus geniculatus*. La transmisión vectorial de *T. cruzi* al hombre se debe básicamente al contacto de estos vertebrados con las heces del vector infectados, los cuales contienen los tripomastigotes metacíclicos infectivos (Dias, 1992).

Usualmente, los insectos defecan sobre el hospedero vertebrado mientras se alimentan y las heces contaminadas pueden ser inadvertidamente pasadas sobre la mucosa de los ojos, nariz, boca o piel herida, permitiendo la entrada de los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. No obstante, en el ciclo selvático es común que algunos mamíferos insectívoros como los monos y marsupiales se infecten a través de la ingestión de triatomíneos infectados. La tasa de transmisión vectorial depende de varios factores como la densidad de los vectores, fuente alimentaria preferida, longevidad, y la susceptibilidad a diferentes cepas del parásito entre otras. La transmisión a través de la piel intacta probablemente no ocurre y se estima que la probabilidad de infección a través del contacto con un

triatomino infectado es de uno por cada mil (Prata, 2001). El segundo mecanismo de transmisión más importante en el humano es por transfusión sanguínea. Inicialmente el problema solo se limitaba a Latinoamérica, pero debido al alto número de inmigrantes hacia países desarrollados existe la posibilidad de encontrar casos en donde la enfermedad no es común, extendiéndose así su distribución. Factores relacionados con el parásito, el individuo receptor, número de transfusiones recibidas y la prevalencia de la infección en el área están relacionados con el riesgo de adquirir la infección por esta vía. Un grupo considerado de alto riesgo para contraer la infección por esta vía son los pacientes hemofílicos, los cuales requieren de transfusiones frecuentes (WHO, 2002). En Colombia, la tasa de infección por donantes oscila entre el 0 y 12.6% (Behrend *et al.*, 2002). Otras vías de transmisión menos comunes en nuestro país son las formas congénitas de la enfermedad, por transplante de órganos y por accidentes biológicos en laboratorios donde se maneje el parásito (Dias, 1992).

Figura 3. Distribución de los vectores de *Trypanosoma cruzi* en América latina



Fuente: http://www.produccionbovina.com/temas_varios/temas_varios/22-mal_de_chagas.htm

1.1.3. Fases y Formas Clínicas. La enfermedad de Chagas tiene una presentación clínica muy variable. Después de la infección por el parásito, algunos pacientes presentan una fase aguda corta caracterizada por una parasitemia abundante, frecuentemente acompañada por síntomas muy leves e inespecíficos que dificultan el correcto diagnóstico. En esta fase, en menos de 5% de los casos pueden ser observadas complicaciones fatales de orden neurológico y/o cardíaco (Prata, 2001). La fiebre es el signo más importante en esta etapa, encontrándose en el 95% de los casos. El periodo febril persiste de 2 a 4 semanas después del contacto inicial con el parásito y generalmente se acompaña de cefalea, astenia, mialgias y artralgias. El edema subcutáneo se presenta en más del 50% de los casos, sin embargo la cardiopatía parece ser la complicación más frecuente, con presentación de taquicardia sinusal y/o bloqueos de la rama derecha del haz de His (Rassi *et al.*, 2000; WHO, 2002).

La fase aguda es seguida por la forma indeterminada de la enfermedad. Del 50 al 70% de los individuos infectados permanecen en esta fase por el resto de sus vidas, la cual se caracteriza por una ausencia de sintomatología y anormalidades electrocardiográficas o radiológicas; sin embargo, pueden presentarse alteraciones en el sistema nervioso simpático y parasimpático, así como en el nivel de algunos neurotransmisores como la acetilcolina y catecolaminas (WHO, 2002). Después de un largo periodo de latencia, aproximadamente del 15 al 30% de los individuos infectados pueden desarrollar las formas severas de la enfermedad, como cardiopatías, daños en el sistema nervioso periférico o disfunciones del tracto digestivo que pueden llevar a cuadros de megaesófago y/o megacolon (Umezawa *et al.*, 1999).

La manifestación cardíaca puede ser considerada como el aspecto más importante de la enfermedad de Chagas debido a sus características, frecuencia y consecuencias. Esta manifestación varía en intensidad y gravedad de los síntomas. Las manifestaciones digestivas son caracterizadas por un aumento en

el calibre de los órganos, siempre acompañado por inflamación y algún grado de destrucción del sistema nervoso autónomo, lo que puede llevar a alteraciones en los patrones de secreción, motilidad y absorción de nutrientes principalmente en el esófago y colon (Prata, 2001).

Aunque las formas cardíacas y digestivas de la enfermedad presentan aspectos patológicos similares como la inflamación y denervación, ellas difieren en cuanto a la prevalencia y distribución geográfica, las cuales varían entre distintos países y regiones del continente (Dias, 1987 y 1992). En Brasil, la forma asintomática o indeterminada es la más común (60-70%), seguida por las formas cardíacas y digestivas (20-30% y 8-10%, respectivamente) y por las formas cardio-digestivas, que son menos frecuentes con una prevalencia de cerca del 2%. Sin embargo, en el centro de Brasil, Chile y Argentina las formas digestivas de la enfermedad predominan mientras que esta forma prácticamente no es observada en Colombia, Venezuela y América Central (Luquetti *et al.*, 1986; Dias, 1991). La razón para esta heterogeneidad geográfica y el motivo por el cual diferentes pacientes presentan formas clínicas variables permanecen desconocidos, pero muy probablemente, están determinados por la variación genética de *T. cruzi* y la presencia de variaciones genéticas en el hospedero (polimorfismos), sin descartar los factores medioambientales.

Es interesante notar que la importancia relativa atribuida a los aspectos del parásito y de los hospederos en la explicación de la patogénesis de la enfermedad de Chagas varía históricamente, pudiendo ser distinguidas tres fases en la historia del estudio de la enfermedad: la fase del parásito, la fase autoinmune y la fase genómica. En la fase más reciente, la fase genómica, la enfermedad es vista como producto de la interacción de dos genomas altamente variables: parásito y hospedero (Macedo & Pena, 2004).

1.2. *TRYPANOSOMA CRUZI*

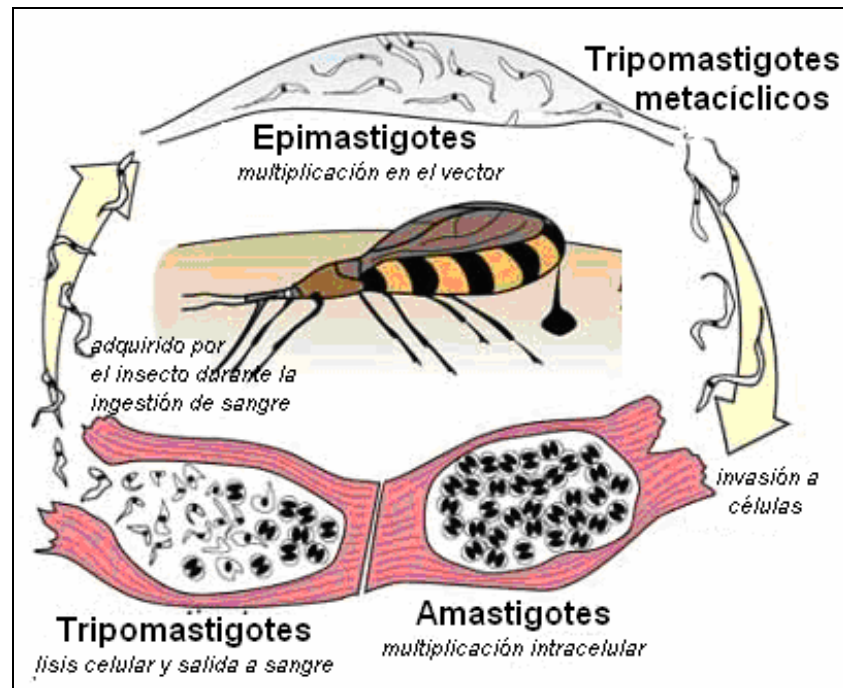
1.2.1 Ciclo de vida. *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado perteneciente a la clase *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae* y se caracteriza por la presencia de una organela en forma de bastón o redondeada denominada kinetoplasto que contiene el DNA extranuclear del parásito. *T. cruzi* presenta tres estadios de acuerdo a la morfología celular y la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto: amastigote, epimastigote, y tripomastigote: los amastigotes se caracterizan por ser células redondeadas de 2 a 4 μm , en las que se distinguen el núcleo y el kinetoplasto. Poseen un flagelo corto no emergente, el cual no se distingue mediante microscopía de luz. Esta es la forma de multiplicación intracelular en el mamífero. Los epimastigotes son células fusiformes de aproximadamente 20 a 30 μm con el kinetoplasto ubicado delante del núcleo, tienen una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Se multiplica por fisión binaria en el intestino del vector y es la forma predominante en los medios de cultivo. Al igual que los epimastigotes, los tripomastigotes conservan la morfología fusiforme de aproximadamente 20 a 25 μm de largo, poseen un citoplasma granuloso con un núcleo central y presenta un kinetoplasto subterminal, de éste nace una membrana ondulante que en su borde libre lleva un flagelo. Se encuentra circulando en la sangre de los mamíferos y en el extremo posterior de los vectores como tripomastigotes metacíclicos, formas infectantes del parásito; esta forma no se divide.

En condiciones naturales el ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre un hospedero invertebrado, correspondiendo a una de las más de 130 especies de hemípteros de la familia *Reduviidae*, y un hospedero vertebrado, estando relacionadas más de 100 especies de mamíferos de diferentes ordenes (Zeledon & Rabinovich, 1981; WHO, 2002). Durante su ciclo, *T. cruzi* pasa por diferentes estadios de desarrollo en cada uno de los hospederos: epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos infectivos en vectores hematófagos y amastigotes intracelulares

replicativos y tripomastigotes en el torrente sanguíneo de los hospederos mamíferos. Después de la picadura del vector el parásito penetra la piel e ingresa al torrente sanguíneo, circulando por un corto periodo de tiempo antes de entrar a los tejidos a diferenciarse en forma de amastigotes intracelulares. Estos se diferencian en tripomastigotes que ingresan de nuevo a la circulación y pueden infectar otros triatominos cuando se alimentan (Figura 4).

1.2.2 Caracterización biológica. *Trypanosoma cruzi* fue descrito por primera vez en 1909 por Carlos Chagas. Desde entonces este parásito ha sido objeto de constantes estudios debido a su gran variabilidad intraespecífica, incluyendo desde aspectos morfológicos hasta avanzados marcadores moleculares (Macedo & Pena, 1998; Souto & Zingales, 1993; Brisse *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2006).

Figura 4: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



Fuente: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolCont.html>

Realizando un análisis por microscopia óptica de los tripomastigotes sanguíneos de diferentes cepas de *T. cruzi*, Brener demostró en 1965 la presencia de algunas variantes morfológicas. Él observó tres formas básicas: delgadas, largas e intermediarias (Brener, 1965). La caracterización biológica de diferentes cepas de *T. cruzi*, aisladas tanto de vectores como de pacientes mostró que las poblaciones de parásitos son heterogéneas en cuanto a virulencia, capacidad de invasión celular e infectividad (Mortara, 2005), susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos (Brener *et al.*, 1976; Murta *et al.*, 1998), constitución antigénica y propiedades bioquímicas (Zingales *et al.*, 1984), propiedades inmunológicas (Di Noia *et al.*, 2002), tropismo tisular diferenciado en ratones (Andrade, 1982; Andrade *et al.*, 1999) y capacidad de transmisión vectorial diferenciada (de Lana *et al.*, 1998).

La heterogeneidad del taxon *T. cruzi* representa un profundo significado biológico. El conjunto de características heterogéneas de las distintas poblaciones de *T. cruzi*, unido a los hábitos alimenticios de los insectos vectores y el conjunto de hospederos vertebrados presentes en un determinado ambiente definen dos ciclos de transmisión de *T. cruzi* a los hospederos vertebrados: el ciclo silvestre, que involucra principalmente marsupiales y pequeños roedores y el ciclo doméstico, que involucra primates y algunas especies de mamíferos (WHO, 2002)

1.2.3 Caracterización bioquímica. Basándose en el polimorfismo observado en los perfiles electroforéticos de seis enzimas, Miles *et al.*, (1977, 1978) y Romanha *et al.*, (1979) clasificaron el parásito en tres y cuatro grupos, respectivamente, a los que denominaron Zimodemas. Los grupos Z1 y Z3 de Miles agrupaban principalmente parásitos provenientes del ciclo silvestre y el Z2 los de ciclo doméstico. Posteriormente estos estudios fueron ampliados al análisis de 15 loci diferentes en 121 muestras de *T. cruzi* aisladas de diferentes áreas geográficas y pertenecientes tanto al ciclo silvestre como al ciclo doméstico. Este análisis mostró un aumento en el número de variantes de isoenzimas de los tres grupos iniciales a 43 grupos o "clonets" diferentes, haciendo evidente la gran heterogeneidad

genética de estos parásitos (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1988; Barnabé *et al.*, 2000) y la necesidad de profundizar el conocimiento en cuanto a la variabilidad biológica y genética del parásito.

1.2.4 Caracterización genética. La variabilidad a nivel del DNA de *T. cruzi* fue demostrada por primera vez a través de la restricción del DNA del kinetoplasto (kDNA), purificado a partir de 10^8 parásitos. Esta técnica generó perfiles de bandas específicos para cada cepa, los cuales fueron denominados esquizodemas (Morel *et al.*, 1980; Carneiro *et al.*, 1991). Posteriormente, la técnica de esquizodemas fue simplificada, con la digestión directa de los amplificadores de PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) del fragmento de 330pb conteniendo las regiones variables del minicírculo (Sturm *et al.*, 1989).

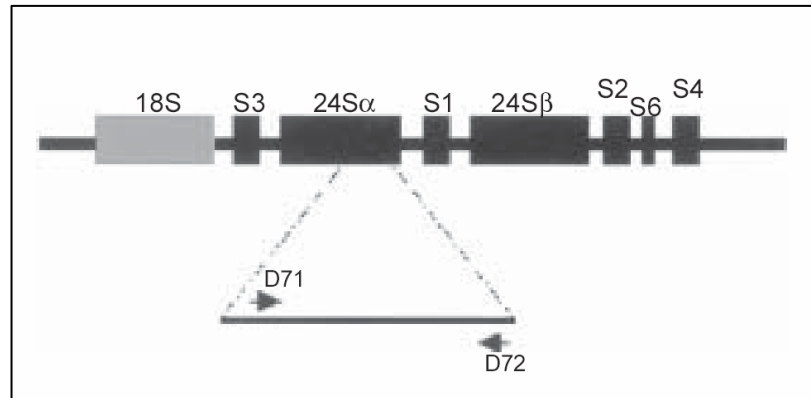
Posteriormente se han utilizado muchas otras técnicas moleculares para el estudio de la variabilidad genética en *T. cruzi*. El uso de sondas multilocales aisladas de minisatélites humanos demostró un poder de discriminación entre cepas y clones de *T. cruzi* semejante al esquizodema, pero con la ventaja de constituir una técnica mas simple y estable (Macedo *et al.*, 1992). También fue demostrada la presencia en el genoma de *T. cruzi* de microsatélites hipervariables, aumentando todavía más el poder discriminatorio entre poblaciones y clones de este parásito (Oliveira *et al.*, 1998; Pimenta, 2002).

Análisis comparativos de las secuencias del gen que codifica para la subunidad 24S α del RNA ribosomal (rRNA 24S α) de *T. cruzi* con las de otros tripanosomátidos mostraron una alta homología, con excepción de una región ubicada en el extremo 3' del gen (dominio D7). Los iniciadores específicos D71 y D72 diseñados para amplificar esa región variable fueron capaces de demostrar un polimorfismo en el tamaño del producto de amplificación en las diferentes cepas analizadas (Figura 5) (Souto & Zingales, 1993). A partir de este resultado fue propuesta la clasificación de las cepas de *T. cruzi* en dos grandes grupos:

Linaje 1, conteniendo las cepas donde se presentaba amplificación de un fragmento de 125 pb y linaje 2 que agrupó las cepas que presentaban un fragmento amplificado de 110 pb. Con el aumento del número de muestras, fue observada la existencia de un tercer grupo de cepas que presentaban las dos bandas de los productos de amplificación del gen rRNA 24S α (110 y 125 pb), siendo denominado grupo 1/2 (Souto, 1996). Posteriormente, Mendonça *et al.* (2002) y Pimenta (2002) observaron que algunas cepas clasificadas como pertenecientes al zimodema 3, presentaban un producto de PCR del gen rRNA 24S α de tamaño intermedio (117-119) pb correspondiendo tal vez, a un nuevo grupo de rRNA.

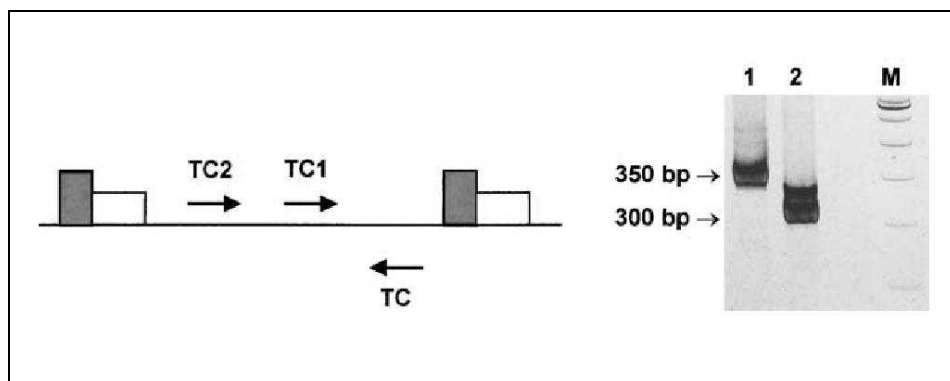
Otra característica singular de los tripanosomátidos es la existencia de una secuencia idéntica de 39pb en el extremo 5' de todos mRNAs, denominada "splice leader" o SL. Esta secuencia SL es codificada por genes denominados mini-exon que están presentes en el genoma nuclear del parásito, con centenares de copias repetidas en tandem. La comparación de los genes de mini-exon de diferentes cepas de *T. cruzi* mostró inicialmente la existencia de dos alelos discretos, presentando una alta divergencia de la secuencia en la región íntergénica donde el nivel de similaridad entre ellos fue menor de 59% (Murthy *et al.*, 1992; Souto *et al.*, 1996). Una PCR múltiple diseñada para la amplificación del espaciador no transcrito del gen de mini-exon fue desarrollada por Souto *et al.*, (1996), utilizando tres diferentes iniciadores, dos de ellos específicos para cada alelo (TC1 y TC2) y el tercero común para ambos grupos (TC). Con esa metodología fue posible clasificar las cepas de *T. cruzi* en dos grupos de acuerdo con el tamaño del producto amplificado. Las cepas que presentaron un producto de 300 pb fueron designadas como pertenecientes al linaje 1, mientras que aquellas que presentaron un producto de 350 pb fueron designadas como pertenecientes al linaje 2 (Figura 6) (Souto *et al.*, 1996).

Figura 5. Representación esquemática del rRNA de *T. cruzi*. Se muestra la región amplificada por los iniciadores D71 y D72.



Fuente: Macedo & Pena, 2004.

Figura 6. Representación esquemática de la región amplificada por los iniciadores TC, TC1 y TC2 en el espaciador intergénico del mini-exon de *T. cruzi*.



Fuente: Guhl *et al.*, 2002.

Trabajando con las mismas muestras analizadas para el gen del rRNA 24S α , los autores anteriormente mencionados encontraron una excelente correlación entre la división basada en la amplificación del gen de mini-exon y la clasificación obtenida anteriormente en los análisis del gen de rRNA (Souto *et al.*, 1996). Además, ellos observaron una asociación de las cepas pertenecientes al linaje 1 con el ciclo doméstico del parásito y de aquellas del linaje 2 con el ciclo silvestre (Zingales *et al.*, 1998). Además comparando los nuevos resultados con aquellos obtenidos anteriormente a través de los zimodemas de Miles *et al.*, (1978), se observó que las cepas del linaje 1 se correlacionan con aquellas pertenecientes al zimodema 2, mientras que las cepas de linaje 2 pertenecen al zimodema 1 (Fernandes *et al.*, 1998).

1.2.5. Clasificación actual de *Trypanosoma cruzi*. Debido a la cantidad de marcadores que indicaban el agrupamiento de gran parte de las cepas de *T. cruzi*, en abril de 1999 durante el Simposio Internacional Conmemorativo de los 90 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas en Rio de Janeiro fue reconocida la subdivisión de la especie *T. cruzi* en dos grupos principales, oficializándose la nomenclatura inicial de *T. cruzi* I, correlacionado con el ciclo silvestre, y *T. cruzi* II comprendiendo cepas del ciclo doméstico de la enfermedad. Las siguientes reglas fueron establecidas para esta nueva nomenclatura (Anónimo, 1999):

a) Las cepas deben ser designadas como *T. cruzi* I cuando sean equivalentes al Zimodema 1 (Miles *et al.*, 1978), al Tipo III (Andrade *et al.*, 1974), al linaje 2 de rRNA (Souto *et al.*, 1996), al Grupo I (Tibayrenc, 1995), a los Ribodemas II/III (Clark & Pung, 1994) o similares;

b) Las cepas deben ser designadas como *T. cruzi* II cuando sean equivalentes al Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1978), Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979) al Tipo II (Andrade *et al.*, 1974), al linaje 1 de rRNA (Souto *et al.*, 1996), al Grupo II (Tibayrenc, 1995), al Rimodema I (Clark & Pung, 1994) o similares;

c) Las cepas que no fueron previamente caracterizadas o cuya caracterización fue considerada no concluyente deben ser designadas como *T. cruzi* (sin designación de grupo);

d) La designación de cepas aparentemente híbridas como las clasificadas como Zimodema 2b Chileno (Miles *et al.*, 1984), Zimodema B (Romanha *et al.*, 1979), Tipo I (Andrade *et al.*, 1974), Grupo 1/2 tipificado por rRNA (Souto *et al.*, 1996), clonot 39 (Tibayrenc, 1995) sería decidida después de estudios adicionales. Situación semejante se observó para el Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1978).

Posteriormente, utilizándose un análisis de 22 locus de isoenzimas y de 20 iniciadores para RAPD (del inglés, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*), Brisse *et al.*, propusieron la subdivisión del grupo *T. cruzi* II en cinco sub linajes (IIa, IIb, IIc, IId y IIe) para permitir la inclusión de las cepas híbridas y de aquellas caracterizadas como zimodema Z3. En contraste, el linaje *T. cruzi* I no pudo ser subdividido utilizando los mismos marcadores. (Brisse *et al.*, 2001 y 2003). A pesar de aún no haber sido oficialmente aceptada, esta subdivisión ha recibido una gran aceptación de la comunidad científica y ha sido muy citada.

Las cepas con características híbridas también han sido objeto de constantes investigaciones. Estos estudios ganaron impulso después de la demostración de la capacidad de recombinación de las células de *T. cruzi in vitro* (Gaunt *et al.*, 2003). En este trabajo a través de la selección artificial de parásitos recombinantes resistentes a drogas, fue demostrada la fusión de los genotipos nucleares parentales con pérdida de algunos alelos y evidencias de procesos de recombinación homóloga. En todos los casos se observó la ausencia de fusión del DNA mitocondrial, sugiriendo un modelo de recombinación en el cual uno de las poblaciones parentales es el “donante” del material nuclear y el otro es “receptor”, el cual mantiene su DNA del kinetoplasto (Gaunt *et al.*, 2003). Es importante resaltar que a pesar de ser capaz de realizar recombinación *in vitro*, *T. cruzi* se reproduce predominantemente a través de fisión binaria. En consecuencia su

genotipo nuclear diploide es transmitido en “bloques” para la descendencia, lo que probablemente origina los elevados niveles de desequilibrio de ligamiento observados (Oliveira *et al.*, 1998) y la estructura típicamente clonal de la población de parásitos (Tibayrenc & Ayala, 2002). A pesar que la fusión de células de *T. cruzi* no parecer ser un fenómeno común, estudios basados en análisis de patrones de isoenzimas (Carrasco *et al.*, 1996; Bogliolo *et al.*, 1996), RFLP de genes constitutivamente expresados (Higo *et al.*, 2000), RAPD y análisis de cariotipos (Brisse *et al.*, 2003) independientemente, sugieren la existencia de cepas híbridas en poblaciones naturales. Análisis de secuencias nucleares y mitocondriales confirman la existencia de estos híbridos (Sturm *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2001) y con el proyecto genoma del parásito esto quedó claramente demostrado para la cepa CL Brener (El Sayed *et al.*, 2005a).

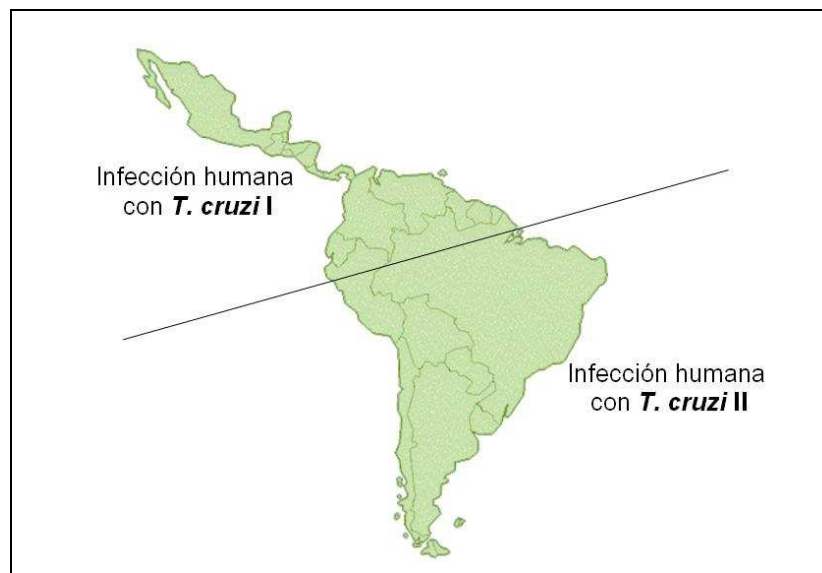
Recientemente, se ha sugerido que las poblaciones de *T. cruzi* podrían ser divididas en tres linajes ancestrales, basándose en las diferencias encontradas en las secuencias de los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa subunidad II (*COII*), Citocromo B (*CYb*) y la subunidad I de la NADH deshidrogenasa (*NDI*) (Freitas *et al.*, 2006). Este trabajo se llevó a cabo analizando el DNA de 75 cepas de *T. cruzi* representativas de los ciclos doméstico y selvático, y obtuvo una mayor evidencia filogenética que soporta la existencia de tres grupos ancestrales y no dos como se había propuesto anteriormente (Westenberger *et al.*, 2005). El tercer grupo ancestral, denominado *T. cruzi* III, correspondería al *T. cruzi* IIc de Brisse *et al.* Se diseñó un ensayo de amplificación de una región específica del gen *COII*, y posterior digestión con la enzima de restricción *AluI* de los productos generados. Esta estrategia resultó útil para diferenciar los tres linajes ancestrales mediante el perfil de RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) correspondiente a cada una de las cepas. Este es el intento más reciente de clasificación genética del parásito, y pone de manifiesto la amplia complejidad genética y evolutiva de *T. cruzi*.

1.2.6. Variabilidad de cepas colombianas de *T. cruzi*. En Colombia los trabajos realizados con el objetivo de caracterizar cepas han revelado una alta variabilidad genética en los aislados colombianos de *T. cruzi*. La mayoría de cepas colombianas de *T. cruzi* han sido caracterizadas y agrupadas por zimodemas, y han sido aisladas de vectores, reservorios silvestres y algunas pocas de humanos. Los resultados han mostrado que las cepas aisladas en nuestro país corresponden en su gran mayoría al zimodema Z1 y algunos pocos al zimodema Z3 (Saravia *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1998; Jaramillo *et al.*, 1999). En el departamento de Santander se encontró una distribución similar a la del resto del país, con una predominancia de cepas pertenecientes a los zimodemas Z1 y Z3 aisladas de humano (Angulo, 2000).

Los estudios a nivel genético son pocos, sin embargo se ha encontrado una correspondencia con el análisis de zimodemas al caracterizarse la mayoría de cepas aisladas como *T. cruzi* I. Builes *et al.*, (1998) analizaron 36 cepas colombianas aisladas de humanos, vectores y reservorios mediante la caracterización de los genes del mini-exon y del rRNA 24S y todas correspondieron al linaje *T. cruzi* I. Devia (1999) estudió 20 cepas aisladas de humanos de 5 departamentos de Colombia y en todas correspondieron a *T. cruzi* I. La caracterización de los parásitos aislados de sangre de individuos en la fase crónica de la enfermedad de Chagas de varios departamentos de Colombia reveló que todas las cepas aisladas pertenecían al linaje *T. cruzi* I (Ruiz-García *et al.*, 2001). Este grupo fue también el único identificado en muestras de sangre de pacientes provenientes de Venezuela, México, Panamá y parte de la amazonía Brasileira (Coura *et al.*, 2002) ofreciendo una gran evidencia molecular de que *T. cruzi* I es el principal agente causal de la enfermedad de Chagas en estas regiones. Adicionalmente en el departamento de Santander se realizó un análisis molecular mediante RAPDs y caracterización del espaciador intergénico del mini-exon empleando 8 cepas de *T. cruzi* aisladas de vectores y humanos provenientes de este departamento, encontrándose de nuevo que todas pertenecían al linaje *T.*

cruzi I, y sugiriéndose la existencia de diferencias filogenéticas entre los aislados provenientes de vector y humano (Jaramillo *et al.*, 2004). Se han reportado algunas excepciones en cuanto a la circulación de cepas de *T. cruzi* II en Colombia ya que se han podido aislar algunas cepas caracterizadas como *T. cruzi* IIb a partir de vectores (Triana *et al.*, 1999; Montilla *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2006), y se han podido detectar en heces de triatomíneos infectados por PCR (Vallejo *et al.*, 2001); sin embargo no se han reportado hasta el momento aislamientos de cepas del linaje *T. cruzi* II a partir de humanos en Colombia. Con base en los anteriores resultados se puede observar una distribución geográfica diferencial de los diferentes linajes de *T. cruzi*, ya que la gran mayoría de cepas de *T. cruzi* II han sido aisladas de pacientes provenientes de países del cono sur de Latinoamérica y se han asociado al ciclo doméstico de transmisión, mientras que en países como Colombia, Venezuela, Centroamérica y México predomina el linaje *T. cruzi* I el cual se ha asociado al ciclo silvestre y aparentemente es el genotipo responsable de la mayor parte de los casos de enfermedad de Chagas en estos países (Figura 7).

Figura 7. Distribución geográfica de genotipos de *T. cruzi* involucrados en infecciones humanas



En los últimos años se han realizado estudios con el objetivo de caracterizar y correlacionar la divergencia genética mostrada por los distintos aislados de *T. cruzi* con su origen geográfico o biológico. Salazar *et al.*, intentaron relacionar los aislados de *T. cruzi* con su origen geográfico y biológico mediante la técnica de LSSP-PCR (Salazar *et al.*, 2006). Aunque se han encontrado indicios de asociaciones entre la posición geográfica y el origen biológico, poco se conoce sobre la real distribución de los genotipos que infectan y producen las fases crónicas de la patología ya que las cepas utilizadas provienen en su mayoría de vectores o reservorios y muy pocas provienen de pacientes. Herrera *et al.*, postularon una subdivisión de cepas colombianas de *T. cruzi* mediante haplotipos, correlacionándolas con los ciclos doméstico o silvestre (Herrera *et al.*, 2007). También se han analizado polimorfismos en genes nucleares, caracterización por RFLP, RAPD y RNA ribosomal (Cuervo *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2007) encontrándose un elevado polimorfismo y una compleja diversidad genética entre las cepas colombianas empleadas.

A nivel de tejidos los estudios son muy escasos. Mejía *et al.*, utilizando la técnica LSSP-PCR no encontró una distribución diferencial de los clones de *T. cruzi* hacia los tejidos de ratones infectados con 2 cepas colombianas pertenecientes al linaje *T. cruzi* I (Mejía *et al.*, 2005). Sin embargo, y a pesar de los avances en el estudio de la genética de *T. cruzi* en Colombia, hasta el momento no se han realizado aproximaciones utilizando tejidos humanos infectados lo cual supondría el estudio de los parásitos directamente involucrados en el desarrollo de la patología sin los sesgos ocasionados por la utilización de modelos murinos y cepas ampliamente seleccionadas.

1.3. GENOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

1.3.1. Genoma nuclear. El genoma nuclear completo de *T. cruzi* (nDNA), representado por las cepas CL Brener y Esmeraldo fue publicado en el año 2005

(El Sayed *et al.*, 2005a y 2005b). Se estima que el tamaño del genoma diploide oscila entre 106,4 y 110,7 Mb, siendo que por lo menos 50% del genoma está compuesto por secuencias repetitivas, constituido principalmente por grandes familias de genes que codifican para proteínas de superficie, retrotransposones y repeticiones subteloméricas. Cerca del 60% del genoma parece codificar proteínas, siendo predichos 22.570 productos génicos de los cuales poco más de la mitad (12.570) representan copias alélicas. Varios estudios previamente ya habían demostrado que el tamaño del genoma nuclear era extremadamente variable entre las diversas cepas del parásito, oscilando entre 100 y 200 Mb. Este tamaño es superior al de los genomas de otros protozoarios, como por ejemplo *Leishmania major* con 66 Mb o *Trypanosoma brucei* con 25 Mb (El Sayed *et al.*, 2005b) y reflejan directamente el número y el tamaño de los cromosomas en las diferentes cepas y clones del parásito (Silveira, 2000).

La organización de la cromatina de los tripanosomas difiere en varios aspectos de aquella encontrada en los eucariotas superiores y en otros protistas. Los cromosomas no se condensan durante la división celular, dificultando su análisis por los métodos convencionales de citogenética. Por mucho tiempo, se creyó que la falta de condensación cromosómica era debida a la ausencia de histonas en estos organismos, sin embargo posteriormente fue demostrada la presencia de esas proteínas en los tripanosomas. Aún así, la histona H1 de *T. cruzi* difiere en varios aspectos de la proteína encontrada en eucariotas superiores y esas diferencias, posiblemente, impiden que la histona mantenga estable la estructura de la cromatina (Toro, 1988; Aslund *et al.*, 1994).

Solamente a través de la técnica de electroforesis en campo pulsátil, o PFGE (del inglés, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), fue posible observar que el genoma de *T. cruzi* está organizado en por lo menos 20 a 25 bandas cromosómicas en el rango de 0,3 a 4MB (Henriksson *et al.*, 1995). Se observó que la intensidad de las bandas cromosómicas coloreadas con bromuro de etidio varia mucho, indicando

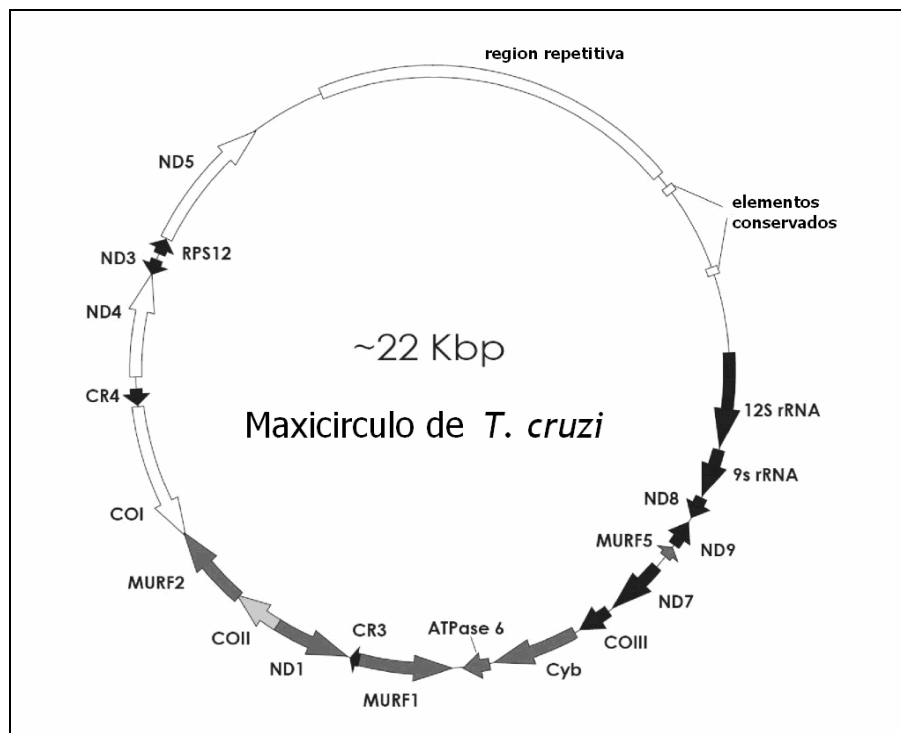
que algunas de esas bandas presentan comigración de más de un cromosoma pudiendo corresponder tanto a cromosomas homólogos como a cromosomas heterólogos de tamaños equivalentes (Cano *et al.*, 1995; Henriksson *et al.*, 1995).

La ploidia de *T. cruzi* por muchos años ha sido objeto de discusión y controversia por diferentes razones. En primer lugar porque no se conocen formas sexuadas del parásito, dificultando el análisis y aislamiento de recombinantes, y la división binaria impide la distinción entre procesos de fusión y división celulares. A pesar de las limitaciones, las evidencias obtenidas con métodos indirectos sugieren que *T. cruzi* es un organismo diploide, lo que fue confirmado recientemente con la culminación del proyecto genoma de *T. cruzi*. El patrón de distribución de varias isoenzimas del parásito es típico de un organismo diploide (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc, 1995). Muchos marcadores genéticos hibridizan con dos bandas cromosómicas, sugiriendo la existencia de dos alelos localizados en cromosomas homólogos de tamaños distintos (Gibson & Miles, 1986). Otro dato consistente con la naturaleza diploide de *T. cruzi* emerge de la comparación de los valores del contenido de DNA estimados por cinética de renaturación y microfluorometría. El contenido de DNA del genoma haploide de la cepa Y, estimado a través de cinética de renaturación, es de 0,13pg de DNA por célula. El valor obtenido por microfluorometría, que mide la cantidad de DNA presente en el núcleo, es de 0,28pg de DNA por célula, es decir, cerca del doble del contenido estimado para el genoma haploide (Borst *et al.*, 1982). Los datos disponibles sugieren que *T. cruzi* es diploide por lo menos para la mayor parte de sus cromosomas, sin excluir la hipótesis de la existencia de cromosomas aneuploides y/o poliploides.

1.3.2. Genoma mitocondrial. Como ocurre con los eucariotas superiores, *T. cruzi* presenta dos genomas distintos, situados en dos compartimientos celulares bien definidos: el núcleo y la mitocondria. Conforme a esto el orden *kinetoplastida* al cual pertenece *T. cruzi* se caracteriza por la presencia del kinetoplasto, una organela que abriga una única y gran mitocondria que presenta un genoma propio,

caracterizando así el genoma extranuclear del parásito conocido como kDNA (kinetoplast DNA). El kDNA de *T. cruzi* está organizado en una red compleja de moléculas circulares concatenadas compuesta por 5 a 10 mil copias de minicírculos con un tamaño de 1,4 Kb aproximadamente y alrededor de 50 copias de maxicírculos con tamaño entre 21 y 39 kb (Degraeve *et al.*, 1988). Los maxicírculos son los equivalentes funcionales del DNA mitocondrial de otros eucariotas, conteniendo los genes para rRNA y proteínas hidrofóbicas mitocondriales en su mayoría envueltas en las vías de fosforilación oxidativa. Una característica importante del genoma de los maxicírculos es la presencia de varios genes donde se observa la falta de algunos elementos claves para su traducción, como codones de iniciación o marcos de lectura abiertos discontinuos, lo que se resolvió a través de la adición y/o remoción de uridinas hechas post-traduccionalmente (Simpson, 1987; Westenberger *et al.*, 2006).

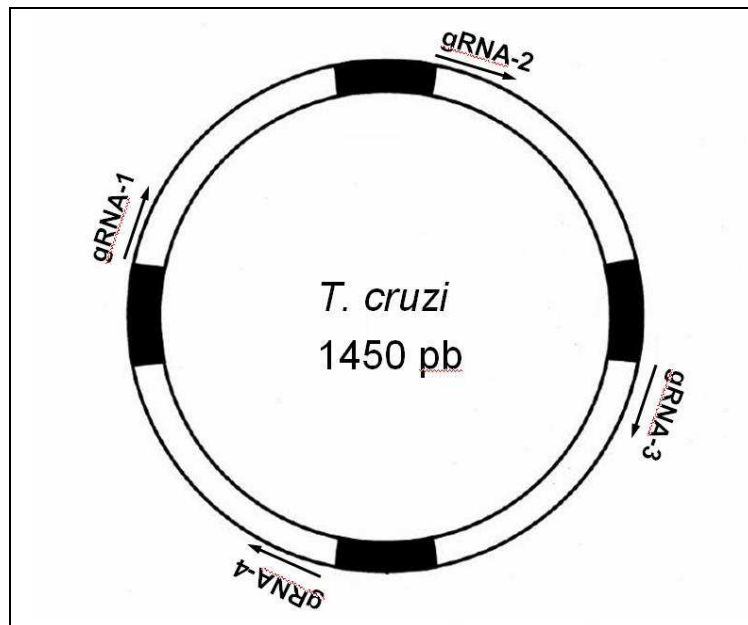
Figura 8: Esquema de una molécula de maxicírculo de *T. cruzi*



Fuente: Westenberger *et al.*, 2006

La secuencia de DNA de los maxicírculos de dos cepas de *T. cruzi* (CL Brener y Esmeraldo) también fue publicada recientemente (El-Sayed *et al.*, 2005a y 2005b). Se demostró que las regiones codificantes de los maxicírculos de las dos cepas presentan poca o ninguna variación de nucleótidos, a pesar de presentar algunas inserciones y/o deleciones cepa-específicas. Además de las regiones codificantes, los maxicírculos de *T. cruzi* también presentan regiones no codificantes variables en tamaño entre 4 a 6 kb (Westenberger *et al.*, 2006) (Figura 8). Cada molécula de minicírculo a su vez, está organizada en cuatro regiones distintas de secuencias extremadamente variables intercaladas por cuatro regiones de secuencias conservadas de 120 a 160pb (Degrave *et al.*, 1988) (Figura 9). Los minicírculos codifican los RNAs-guía (gRNA) que están envueltos en procesos de edición de RNAs-mensajeros producidos por los maxicírculos (Stuart, 1992).

Figura 9. Esquema de una molécula de minicírculo de *T. cruzi*.



La cantidad de minicírculos es altamente variable entre distintas cepas de *T. cruzi* y evoluciona rápidamente, lo que permite la diferenciación entre cepas muy próximas evolutivamente (Junqueira *et al.*, 2005). La diversidad de los minicírculos así como su naturaleza altamente amplificada, hacen que esta molécula sea un buen blanco para el diagnóstico del parásito en individuos con enfermedad de Chagas (Vago *et al.*, 1996; Chiari, 1999).

1.4. PAPEL DEL PARÁSITO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.4.1 Modelo histotrópico clonal. A pesar del gran número de métodos disponibles para el análisis de los parásitos aislados de pacientes y del establecimiento de la alta diversidad genética exhibida por *T. cruzi*, hasta el momento no ha sido posible establecer una correlación clara entre la diversidad genética de *T. cruzi* y la variabilidad clínica de la enfermedad de Chagas (Macedo & Pena, 2004).

Se estima que *T. cruzi* emergió como especie hace cerca de 150 millones de años y el primer contacto con el hombre fue probablemente mucho más reciente, habiendo ocurrido en el pleistoceno hace aproximadamente 15.000 años cuando el hombre llegó a nuestro continente (Briones *et al.*, 1999; Macedo *et al.*, 2001). De este modo, la infección de los humanos por *T. cruzi* puede ser considerada como un accidente en la historia reciente de la evolución del parásito, siendo natural el suponer que no todas las poblaciones del parásito son capaces de infectar los seres humanos y causar la enfermedad de Chagas.

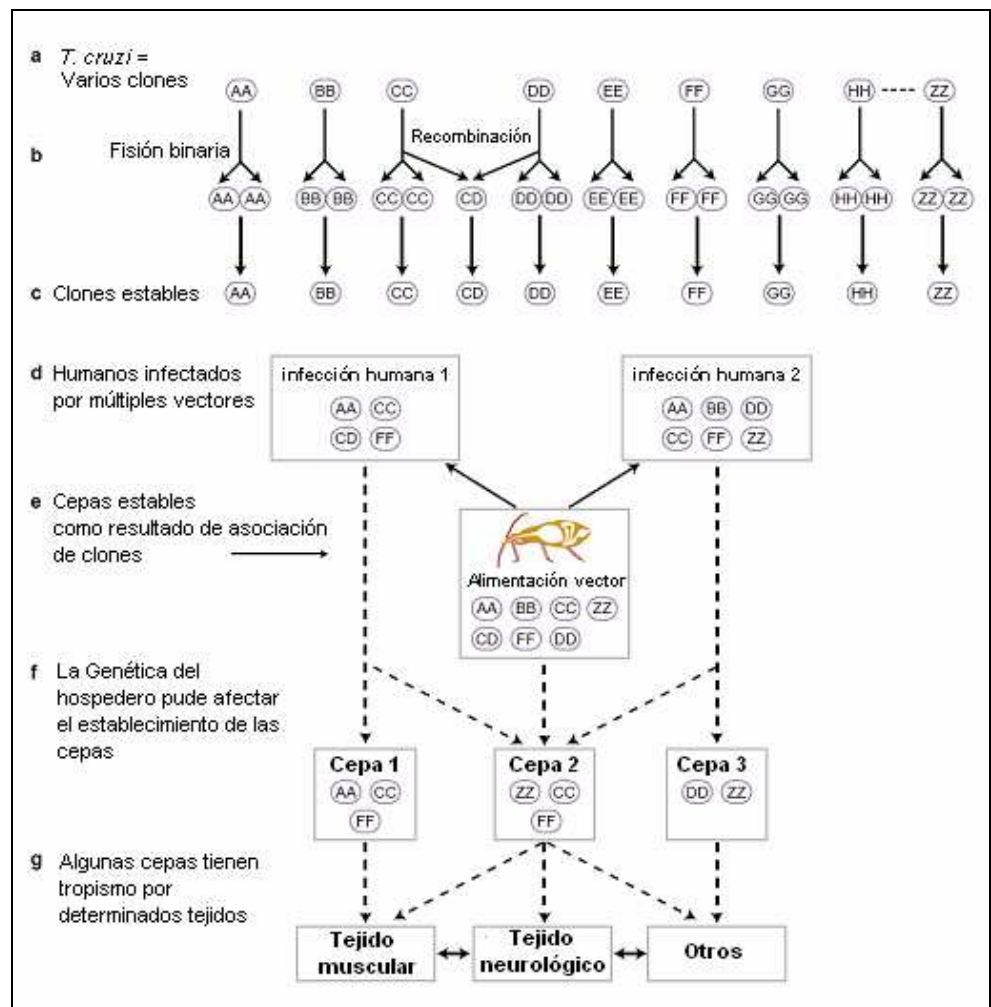
Oliveira *et al.*, en 1997, analizaron perfiles de RAPD para poblaciones diferentes de *T. cruzi* aisladas de pacientes con diversas formas clínicas de la enfermedad en pacientes de Brasil. A pesar de no haberse encontrado ninguna relación directa con los aspectos clínicos, cuando los autores compararon los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de pacientes en las fases crónica y aguda de la enfermedad

con las poblaciones de *T. cruzi* aisladas de vectores y mamíferos silvestres, observaron claramente un gradiente decreciente en la variabilidad en el sentido de los vectores silvestres para los pacientes crónicos (Oliveira *et al.*, 1997). Estos resultados están de acuerdo con la idea de que no todas las cepas de *T. cruzi* son capaces de establecer infecciones eficaces en el hombre y que los seres humanos funcionan como una especie de “filtro”, seleccionando las subpoblaciones del parásito más adaptadas a este hospedero (Macedo & Pena, 1998; Macedo, 2004). Se podría entonces considerar que las cepas de *T. cruzi* representan una colección de clones del parásito que pueden presentar relaciones simbióticas, pero que también compiten por los recursos disponibles. Debido al polimorfismo biológico, diferentes clones de una misma cepa pueden presentar tropismo diferencial por tejidos distintos (músculo cardíaco, plexo mioentérico en el esófago y colon, etc.). Por lo tanto, un determinante importante en el curso clínico de la enfermedad es el conjunto de clones del parásito presente en las cepas infectantes y sus tropismos específicos. Considerando que la mayoría de las técnicas de tipificación utilizadas para la caracterización genética de *T. cruzi* requieren el aislamiento del parásito a partir de sangre del paciente y posterior crecimiento de las cepas en medio de cultivo para extraer el DNA o cultivarlo en masa, existe una amplia oportunidad para que se dé la selección clonal y consecuentemente las subpoblaciones de *T. cruzi* disponibles para el análisis pueden diferir de aquellas que causan realmente las lesiones en los tejidos. Este es el principio básico de la hipótesis que fue denominada “Modelo Histotrópico-clonal de la enfermedad de Chagas” (Macedo & Pena, 1998; Macedo *et al.*, 2002). Este modelo claramente implica la necesidad del desarrollo de metodologías para el análisis genético de los parásitos presentes directamente en los tejidos infectados (Figura 10).

Se han utilizado una variedad de métodos para la caracterización de *T. cruzi* en tejidos, incluyendo la reacción de LSSP-PCR (del inglés, *Low Stringency Single Primer Polymerase Chain Reaction*) (Vago *et al.*, 1996 y 2000), PCR “*in situ*” (Lane

et al., 2003) y PCR competitiva (Centurion-Lara *et al.*, 1994). A pesar de ser muy útiles en el diagnóstico y en la cuantificación de los parásitos en los tejidos, estas metodologías ofrecen poca o ninguna información filogenética y no permiten la determinación de las subpoblaciones de *T. cruzi*. Sin embargo, una de las dificultades de la discriminación de los parásitos directamente en tejidos reside en el hecho de que la parasitemia tisular es muy baja durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, siendo necesario el desarrollo de metodologías para el análisis que sean bastante sensibles y al mismo tiempo informativas.

Figura 10: Modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas.



Fuente: Macedo *et al.*, 2002

Por tanto una alternativa es buscar moléculas blanco naturalmente amplificadas en el genoma del parásito. La región hipervariable de los minicírculos, que está presente en millares de copias por célula, fue utilizada como blanco en la reacción de LSSP-PCR. En resumen, el fragmento de 330pb correspondiente a la porción variable de los minicírculos es pre-amplificada, purificada y sometida a la reacción de LSSP-PCR, que está basada en la amplificación en bajas condiciones de astringencia (exceso de iniciador, de Taq DNA polimerasa y bajas temperaturas de anillamiento). Este método produce perfiles de fragmentos complejos, altamente reproducibles y específicos de cada aislado de *T. cruzi* denominados “kDNA signatures” o perfiles de kDNA (Vago *et al.*, 1996). Los perfiles de kDNA fueron utilizados en la caracterización de los parásitos presentes en tejidos de ratones isogénicos BALB/c después de la infección con una mezcla artificial de dos aislados monoclonales del parásito: la cepa JG, aislada de un paciente con la forma digestiva de la enfermedad, representando a linaje *T. cruzi* II y el clon Col1.7G2, derivado de la cepa colombiana, que fue aislada de un paciente con la forma cardíaca de la enfermedad, correspondiente al linaje *T. cruzi* I (Andrade *et al.*, 1999). Después de seis meses de infección, quedó demostrado que la cepa JG prevalecía en los corazones mientras que el clon Col1.7G2 prevalecía en los rectos y en otros tejidos de los mismos animales, demostrando que diversas cepas pueden colonizar diferentes tejidos del hospedero, validando así, el modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas en ratones.

La metodología de LSSP-PCR también fue utilizada con éxito en la caracterización de los parásitos presentes en diversas muestras de tejidos provenientes de pacientes chagásicos crónicos. Se demostró que diferentes perfiles de kDNA son obtenidas en distintos tejidos de un mismo paciente (Vago *et al.*, 2000), en concordancia con lo que es postulado en el modelo histotrópico clonal. A pesar de la importante demostración de la presencia de diferentes subpoblaciones de parásitos en diferentes tejidos, debido a la propia naturaleza de la reacción de LSSP-PCR no es posible hacer inferencias sobre el número de subpoblaciones y

la posición filogenética de estos parásitos. Una aproximación más acertada es realizar un análisis combinado que utilice marcadores que definan el genotipo del parásito, y muestren las diferencias clonales que puedan existir entre los parásitos presentes en los tejidos afectados.

1.5. PAPEL DEL HOSPEDERO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

A pesar de la cantidad de información sobre la importancia del parásito en la determinación de la patogénesis de la enfermedad de Chagas, está cada vez mas claro que la sola variabilidad del parásito no es suficiente para explicar la diversidad de formas clínicas de la enfermedad (Macedo & Pena, 2004).

La fase crónica de la enfermedad de Chagas posee como característica especial una parasitemia extremadamente baja, la cual se acompaña de una gran inflamación tisular y patrones de autoinmunidad. Estos hallazgos en conjunto llevan a la conclusión de que el patrón de respuesta del hospedero al parásito también está relacionado el desarrollo de la enfermedad (Cunha-Neto *et al.*, 1996; Kierszenbaum, 1999). Varias moléculas del sistema inmune del hospedero son producidas en respuesta a la infección contra *T. cruzi*. Se han observado niveles mayores de interferón gamma (IFN- γ), interleuquina 10 (IL-10) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en pacientes con las formas indeterminadas y crónicas de la enfermedad de Chagas comparadas con individuos no chagásicos. Además, el balance entre la producción de estas tres citoquinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α parece influir en el hecho de que los pacientes infectados desarrollen la forma indeterminada o la cardiopatía severa, pues los individuos con cardiopatías graves presentan respuestas con patrones de inflamación más extensos, mientras que los pacientes con la forma indeterminada generalmente presentan una respuesta mas regulada (Dutra *et al.*, 2005). De acuerdo con esto y considerando que el patrón de respuesta inmune del hospedero se compone de un gran número de moléculas importantes para la producción de manifestaciones clínicas, es

natural postular que la variabilidad genética del hospedero esté envuelta en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

El papel de la variabilidad genética del hospedero en el desarrollo de la enfermedad se ha demostrado mediante estudios de asociación enfocados sobre varios genes implicados en el montaje de la respuesta inmune contra el parásito, tales como las regiones del HLA clase II (Nieto *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2004), gen CCR5 (Calzada *et al.*, 2001) gen TNFA (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2005), los genes BAT1 y NFKBL/IKBL (Ramasawmy *et al.*, 2006 y 2007). En Colombia, Los resultados obtenidos en población santandereana por nuestro grupo mostraron asociaciones con el riesgo de desarrollar la cardiomiopatía chagásica al evaluar distintos polimorfismos de tipo SNP (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) presentes en los genes IL1B (Flórez *et al.*, 2006), IL12B (Zafra *et al.*, 2007), IL4RA y CCR5 (en proceso de publicación). Todos estos datos muestran que la susceptibilidad hacia *T. cruzi* podría estar determinada por las variaciones en un gran número de genes polimórficos y que es el resultado de la interacción de dos genomas altamente complejos: el humano y el del parásito.

Cada vez se hace más evidente la creciente necesidad de estudios que envuelvan un número mayor de factores relacionados con el hospedero y el parásito, para lograr un mayor entendimiento de los mecanismos que llevan a la diversidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. En este trabajo, se analizan marcadores genéticos relacionados con los parásitos presentes en tejidos y por lo tanto directamente involucrados en el desarrollo de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas en humanos, con el propósito de obtener información más detallada sobre la posible distribución genética de los parásitos con relación al desarrollo de distintas formas de la enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

El departamento de Santander presenta altas tasas de seropositividad a *T. cruzi*, las cuales en algunos municipios llegan a superar el 40% (Gutiérrez *et al.*, 2004). Pese a la evidente importancia del estudio de la enfermedad de Chagas en Santander, las publicaciones relacionadas con la caracterización genética de los parásitos circulantes son escasas y en general existe poco conocimiento de la epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*.

El papel atribuido al parásito como factor determinante en la heterogeneidad de la presentación de la enfermedad se ha basado en su variabilidad genética y en las diferencias en la asociación con los ciclos del vector y la presentación de las formas clínicas a nivel geográfico. A nivel global se han realizado numerosos estudios para tratar de establecer una posible correlación entre la cepa infectante y la heterogeneidad clínica, pero la mayoría sin resultados concluyentes.

El carácter multiclonal de los aislados de *T. cruzi* provenientes de vectores y reservorios dificulta el análisis y su posterior correlación con los aspectos clínicos, ya que estos aislados sufren un proceso de selección al ser procesados por metodologías como el hemocultivo y xenodiagnóstico, siendo mantenidas por pases constantes en medios de cultivo; además, diferentes clones de una cepa pueden poseer un tropismo diferente por cada tejido, por lo tanto las poblaciones del parásito obtenidas en el laboratorio podrían ser diferentes de aquellas que están presentes en la circulación o en los tejidos causando la patología (Vago *et al.*, 1996 y 2000; Andrade *et al.*, 1999; Macedo & Pena, 2004).

En Colombia *T. cruzi* presenta mayor heterogeneidad genética con respecto a lo reportado en otros países (Cuervo, 2002; Montilla, 2002; Rodríguez, 2002). Estos estudios han sido realizados a partir de aislados obtenidos de vectores,

reservorios y sangre de pacientes seropositivos a antígenos parasitarios pero no en tejidos de individuos chagásicos. Debido a que los estudios en tejidos de individuos chagásicos son escasos, o realizados con un bajo número de muestras (Vago *et al.*, 1996 y 2000) y el hecho de que en Colombia no se ha adelantado ningún trabajo que involucre tejidos humanos provenientes de pacientes chagásicos, el presente estudio tiene como objetivo realizar la caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* presente en los tejidos afectados y establecer su posible relación con las manifestaciones histológicas propias de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en tejidos de individuos chagásicos provenientes del departamento de Santander, Colombia, con el fin de establecer su perfil de variabilidad genética y su posible relación con las manifestaciones histopatológicas de la enfermedad de Chagas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* presente en tejidos de órganos infectados.

3.2.2 Relacionar los perfiles de variabilidad genética de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en los tejidos con las diferentes alteraciones histopatológicas producidas.

4. METODOLOGÍA

4.1 POBLACION DE ESTUDIO

4.1.1 Tejidos humanos. Para la realización de este estudio se trabajó con 50 muestras de tejidos (45 biopsias de tejido cardíaco, 3 de esófago y 2 de colon) provenientes de autopsias de 45 individuos provenientes del departamento de Santander, con impresión diagnóstica compatible con cardiomiopatía chagásica o enfermedad de Chagas confirmada previamente por histopatología (Tabla 1). Estas biopsias fueron obtenidas de los archivos de Patología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, regional nororiente y del Departamento de Patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. En su gran mayoría, estas biopsias correspondieron a fragmentos de tejido fijados en formaldehído e incluidos en parafina según los procedimientos de rutina de los respectivos laboratorios de origen. Se realizaron análisis histológicos y moleculares (PCR para detección de kDNA y nDNA de *T. cruzi*) para determinar o confirmar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en estas muestras. Las muestras se consideraron positivas para *T. cruzi*, cuando al menos una de las dos PCR anteriormente mencionadas presentaron una amplificación positiva o cuando histopatológicamente se corroboró la presencia del parásito en forma de nidos de amastigotes. Como controles, se utilizaron 10 biopsias de tejido cardíaco correspondientes a pacientes de la misma área geográfica y que presentaban cardiomiopatía no chagásica comprobada (Tabla 1).

4.1.2 Parásitos control. Como controles de amplificación se utilizaron cepas de *T. cruzi* de referencia de los linajes *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Tabla 2), DNA cedido gentilmente por el Dr. Aldo Solari del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Chile y por la Dra. Andrea Macedo del departamento de Bioquímica e Inmunología de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG),

Brasil. Adicionalmente se utilizaron 2 aislados de *T. cruzi* provenientes del área endémica del departamento de Santander en el año 2005; un aislado fue obtenido a partir de hemocultivo de un paciente chagásico crónico y el otro fue aislado a partir del vector *Rhodnius prolixus*. Como controles de amplificación cruzada con otros parásitos se utilizaron cepas de *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania chagasi* y *Leishmania panamensis* (Tabla 2).

Tabla 1. Muestras de tejidos estudiadas y características patológicas asociadas.

Paciente	Muestra	Tejido	Hallazgos patológicos Principales*	Paciente	Muestra	Tejido	Hallazgos patológicos Principales*
1	B-01	Corazón	CD	26	B-31	Corazón	CD
2	B-02	Corazón	CD	27	B-32	Corazón	CD
3	B-03	Corazón	CD	28	B-33	Corazón	CD
4	B-04	Corazón	CD	29	B-34	Corazón	CD
	B-05	Colon	Ninguno	30	B-35	Corazón	CD
	B-06	Esófago	Ninguno	31	B-36	Corazón	CD
5	B-07	Corazón	CD	32	B-37	Corazón	CD
6	B-08	Corazón	CD	33	B-38	Corazón	CD
7	B-09	Corazón	CD	34	B-39	Corazón	CD
8	B-10	Corazón	CD	35	B-40	Corazón	CD
9	B-11	Corazón	CD	36	B-41	Corazón	CD
10	B-12	Corazón	CD	37	B-42	Corazón	CD
11	B-13	Corazón	CD	38	B-43	Corazón	CD
12	B-14	Corazón	CD	39	B-44	Corazón	CD
13	B-15	Corazón	CD	40	B-45	Corazón	CD
14	B-16	Corazón	CD	41	B-46	Corazón	CD
15	B-17	Corazón	CD	42	B-47	Corazón	CD
16	B-18	Corazón	CD	43	B-48	Corazón	CD
17	B-19	Corazón	CD	44	B-49	Corazón	CD
18	B-20	Corazón	CD	45	B-50	Corazón	CD
	B-21	Esófago	Ninguno	46	C-01	Corazón	CSG
19	B-22	Corazón	CD	47	C-02	Corazón	CCG
20	B-23	Corazón	CD	48	C-03	Corazón	CTB
21	B-24	Corazón	CD	49	C-04	Corazón	CTB
22	B-25	Corazón	CD	50	C-05	Corazón	CTB
23	B-26	Corazón	CD	51	C-06	Corazón	CTB
	B-27	Esófago	Ninguno	52	C-07	Corazón	CA
	B-28	Colon	Ninguno	53	C-08	Corazón	CN
24	B-29	Corazón	CD	54	C-09	Corazón	ICC
25	B-30	Corazón	CD	55	C-10	Corazón	ICC

CD= Cardiopatía Dilatada; CSG= Cardiopatía asociada a Síndrome de Good Pasteur; CTB= Cardiopatía asociada a Tuberculosis; CCG= Cardiopatía congénita; CA= Cardiopatía aterosclerótica; CN= Cardiopatía asociada a neumonía.

Tabla 2. Parásitos utilizados como controles en este estudio.

Parásito	Cepa/Aislado	Hospedero/Vector	Procedencia	Clasificación
<i>Trypanosoma cruzi</i>	338	<i>Homo sapiens</i>	Santander, Colombia	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma cruzi</i>	339	<i>Rhodnius prolixus</i>	Santander, Colombia	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Munantá	<i>Rhodnius prolixus</i>	Boyacá, Colombia	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Colombiana	<i>Homo sapiens</i>	Colombia	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Y	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	<i>T. cruzi</i> IIb
<i>Trypanosoma cruzi</i>	CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	<i>T. cruzi</i> IIe
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Silvio X10 cl10	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma cruzi</i>	CBB cl3	<i>Homo sapiens</i>	Chile	<i>T. cruzi</i> IIb
<i>Trypanosoma cruzi</i>	V195	<i>Triatoma infestans</i>	Chile	<i>T. cruzi</i> IIe
<i>Trypanosoma cruzi</i>	13379 cl3	Humano	Bolivia	<i>T. cruzi</i> I
<i>Trypanosoma rangeli</i>	C23	Vector	Sucre, Colombia	-
<i>Leishmania chagasi</i>	-	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	-
<i>Leishmania panamensis</i>	LS94	<i>Homo sapiens</i>	Panamá	-

4.1.3 Muestras de DNA Humano. En el estudio fueron incluidas 7 muestras de DNA de sangre periférica proveniente de pacientes distintos a los que se les extrajeron los tejidos, habitantes de la misma área endémica del departamento de Santander. La presencia de *T. cruzi* en la sangre de estos pacientes había sido demostrada previamente por PCR, y clínicamente se encontraban clasificados en diferentes estadios de la enfermedad de Chagas. Estas muestras de DNA fueron caracterizadas para conocer el genotipo de *T. cruzi* al cual pertenecían y posteriormente fueron utilizadas en los ensayos de LSSP-PCR, con el fin de comparar los perfiles obtenidos en la sangre de estos pacientes con los obtenidos en tejidos y las cepas control. Las características clínicas de los pacientes y la detección de *T. cruzi* por PCR se muestran en la tabla 3.

4.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDOS

4.2.1 Extracción de ADN. El proceso de extracción de DNA de los tejidos embebidos en parafina, se inició cortando 2 secciones de tejido de 10 µm de espesor a partir de cada bloque de tejido, utilizando cuchillas de micrótopo estériles para cada muestra (Leica mycosystems, Germany). Seguidamente las

secciones de tejido se desparafinaron utilizando el método de microondas previamente descrito (Zafra *et al.*, 2004). Posteriormente los tejidos se digirieron a 56°C en 114 µl de solución de digestión (Tris-HCl 100mM, EDTA 40mM pH 8.0, SDS 5%) y 6 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Bioline, USA). El tiempo de digestión varió entre 12 y 24 horas. Para precipitar las proteínas se trató con 150 µl de acetato de sodio 5M, se centrifugó a 6.000 g por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregaron 400 µl de isopropanol para precipitar el DNA, se centrifugó y se lavó con etanol al 70%. Los DNA fueron resuspendidos en 20 µL de buffer TE1X (Tris-EDTA, pH 8.0) y almacenados a -20°C hasta su uso. Adicionalmente se realizó una segunda extracción de DNA de cada bloque de tejido utilizando el kit comercial MagneSil® Genomic Fixed Tissue System (Promega, USA) y resuspendiendo en 25 µL de buffer TE1X (Tris-EDTA, pH 8.0).

Tabla 3. Clasificación clínica de pacientes chagásicos cuyo DNA fue utilizado como control en los ensayos de LSSP-PCR.

Estadio Chagas*	Paciente	Edad	PCR kDNA
I	CHS277	43	330 pb
I	CHS330	54	330 pb
II	CHS275	59	330 pb
III	CHS023	41	330 pb
III	CHS295	79	330 pb
III	2138	79	330 pb
IV	CHS016	69	330 pb

*: Clasificación clínica y electrocardiográfica de la enfermedad de Chagas en estadios según la OMS-OPS (Véase el anexo A).

4.2.2 Análisis histopatológico de tejidos. Se cortaron y colorearon 2 láminas a partir de cada tejido con el método de hematoxilina-eosina (HE) y se realizó un minucioso análisis histológico en búsqueda de alteraciones tisulares significativas tales como intensidad del infiltrado linfocitario, histiocitario, fibrosis focal, hipertrofia difusa y presencia de amastigotes del parásito, con el fin de relacionar estos hallazgos con el genotipo de los parásitos presentes en los tejidos analizados.

4.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para confirmar la presencia de *Trypanosoma cruzi*, tanto los tejidos como las cepas utilizadas en el estudio fueron analizadas molecularmente utilizando la metodología de PCR para detectar el kDNA y nDNA, tal como se describe a continuación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3.1 Amplificación de las regiones hipervariables del kDNA de *T. cruzi*. Para la amplificación del fragmento de 330 pb de las regiones hipervariables de los minicírculos de *T. cruzi* (kDNA) se utilizaron los iniciadores S35 (5'-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y S36 (5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3') descritos anteriormente (Avila *et al.*, 1993). Las amplificaciones se hicieron en un volumen final de 20 µl conteniendo 10mM de Tris-HCl pH 9, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 0,1% de Tritón X-100, 200mM de cada uno de los dNTPs, 0,6µM de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerasa (Corpogen, Colombia) y 1 µl de DNA de tejidos, o 1ng de DNA de parásito. La amplificación se llevó a cabo durante 30 ciclos con denaturación a 94°C por 1 min, anillamiento a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Un volumen de 20 µl de los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% (ISC BioExpress, USA) en buffer TAE1X por 90 minutos a 90V, visualizados por tinción con bromuro de etidio en transiluminador UV y fotografiados.

4.3.2 Detección de *T. cruzi* por amplificación del nDNA. Para la amplificación del fragmento de 188 pb de las secuencias nucleares repetitivas del DNA de *T. cruzi* (nDNA) se utilizaron los iniciadores TCZ1 (5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3') y TCZ2 (5'-CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3') previamente descritos (Moser *et al.*, 1989). Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo 10mM de Tris-HCl pH 9, 1,5mM de MgCl₂,

50mM de KCl, 0,1% de Tritón X-100, 200mM de cada uno de los dNTPs, 0,5µM de cada iniciador, 0,6U de Taq DNA polimerasa (Corpogen, Colombia) y 1 µl de DNA de tejidos, o 1ng de DNA de parásito. La amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos con denaturación a 94°C por 20 segundos, anillamiento a 60°C por 10 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Un volumen de 20 µl de los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE1X por 90 minutos a 90V, visualizados por tinción con bromuro de etidio en transiluminador UV y fotografiados.

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para determinar el genotipo de los parásitos detectados en las muestras de tejidos y sangre, así como para caracterizar las cepas control utilizadas se analizaron los polimorfismos presentes en los genes del RNA ribosomal subunidad 24 (rRNA 24S), RNA ribosomal subunidad 18 (rRNA 18S), espaciador intergénico de los genes del mini-exon y el gen mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad II (*COII*). Adicionalmente se tipificaron 4 microsátelites polimórficos para determinar la naturaleza clonal de los parásitos encontrados y por último se realizó la técnica de LSSP-PCR para obtener los perfiles específicos que permitieran establecer diferencias individuales entre las poblaciones del parásito presentes en los diferentes tejidos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

4.4.1 Amplificación de la región 3' del RNA ribosomal 24Sα. La caracterización del gen de rRNA 24Sα se realizó mediante amplificación del dominio divergente D7 utilizando los iniciadores D71 (5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG-3') y el D72 (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'), previamente descritos (Souto & Zingales, 1993). Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl

que contenían 10mM de Tris-HCl pH 9, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 0,1% de Tritón X-100, 200mM de cada uno de los dNTPs, 0,5µM de cada iniciador, 0,5U de Taq DNA polimerasa (Corpogen, Colombia) y 1 µl de DNA de tejidos o 1ng de DNA de parásito. La amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos con denaturación a 94°C por 40 segundos, anillamiento a 58°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación esperados son 110 pb para el grupo 1, y 125 pb para el grupo 2 (Souto *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2001).

Los productos obtenidos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa “Low Melting Point” (MoBio, USA) al 3.5% en Buffer TAE1X, por aproximadamente 2 horas a 90V y visualizados también en transiluminador UV mediante coloración con bromuro de etidio.

4.4.2 Amplificación del gen de RNA ribosomal 18S. La caracterización del gen de rRNA 18S se realizó por amplificación de un dominio de tamaño variable localizado en la posición entre 994 (3') a 1164 (5'). Los iniciadores utilizados fueron V1 (5'-CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA- 3') y V2 (5'-TTG AGG GAA GGC ATG ACA CAT GT-3'). Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenían 10mM de Tris-HCl pH 9, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 0,1% de tritón X-100, 200mM de cada uno de los dNTPs, 0,2µM de cada iniciador, 0,5U de Taq DNA polimerasa (Corpogen, Colombia) y 1 µl de DNA de tejidos, o 1ng de DNA de parásitos. La amplificación se llevó a cabo durante 30 ciclos con denaturación a 94°C por 1 min, anillamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos esperados son un fragmento único de 155 pb para el linaje IIa, 165 pb para los IIb, c y d. El linaje I presenta un producto de 175 pb (Brisse *et al.*, 2001).

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%, en buffer TBE 1X por aproximadamente 3

horas a 100 V. Después de la electroforesis los fragmentos fueron visualizados mediante coloración con nitrato de plata según el protocolo descrito por Sanguinetti *et al.* (1994) con algunas modificaciones: El gel fue fijado a temperatura ambiente durante 10 minutos en solución fijadora conteniendo 10% de etanol absoluto y 0.5% de ácido acético, seguida de una incubación de 10 minutos en una solución conteniendo 0.1% de nitrato de plata, 5% de etanol y 0.25% de ácido acético. La revelación fue hecha en una solución conteniendo 3% NaOH y 0.3% de formaldehído 37% (v/v), llegado el momento se detuvo la reacción de revelado con solución fijadora y el gel fue fotografiado.

4.4.3 Amplificación del espaciador no transcrito de los genes del mini-exon.

La caracterización de los genes de mini-exon se realizó usando tres iniciadores, TC (5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3'), TC1(5'-GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC-3') y TC2 (5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3'), con las mismas condiciones de reacción que para rRNA 24S α y utilizando 0,2 μ M de cada uno de los tres iniciadores durante 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión fina I a 72°C por 5 minutos. Los productos esperados son un fragmento de 350 pb para el grupo I y 300 pb para el grupo 2 (Souto *et al.*, 1996). Un volumen de 20 μ l fue sometido a electroforesis en gel de agarosa "Low Melting Point" al 3% en buffer TAE1X por aproximadamente 2 horas a 90V, visualizados por tinción con bromuro de etidio en transiluminador UV y fotografiados.

4.4.5 Polimorfismo en el gen Citocromo Oxidasa II (COII) del ADN mitocondrial.

Para la amplificación de la región génica que comprende la subunidad II de la enzima mitocondrial Citocromo Oxidasa de *T. cruzi*, se utilizó una estrategia de "full-nested PCR". Para la primera ronda de amplificación, el DNA de las muestras fue sometido a una PCR compuesta de 10mM Tris-HCl pH 8,8, 25mM KCl, 3,5mM MgCl₂, 1U Taq DNA Polimerasa (Promega, USA), 250 μ M de cada dNTP, 0,3 μ M de los iniciadores TcMit31-ex (5'-TAA ATA ATA TAT ATT

GTA CAT GAG-3') y TcMit40-ex (5'-CTR CAT TGY CCA TAT ATT GT-3'), y 3 μ L de DNA ,en un volumen final de 15 μ L. Los ciclos de amplificación consistieron de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, anillamiento por 45 segundos y extensión por 1 minuto. La segunda ronda de amplificación se llevó a cabo utilizando como DNA molde, 10% de los productos obtenidos en la primera ronda de amplificación. Las condiciones de los ciclos de amplificación y las concentraciones de los reactivos fueron los mismos, excepto los iniciadores, los cuales fueron TcMit10-int (5'-CCA TAT ATT GTT GCA TTA TT-3') y TcMit21-int (5'-TTG TAA TAG GAG TCAT GTT T-3').

Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% para verificar la amplificación, y después sometidos a una digestión con 1U de la enzima de restricción *AluI* (New England Biolabs) por 16 horas a 37°C. Los productos digeridos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 6% en buffer TBE 1X por aproximadamente 3 horas a 100 V. Después de la electroforesis, los fragmentos fueron visualizados mediante coloración con nitrato de plata como se describió anteriormente para el rRNA ribosomal 18S.

El análisis por RFLP en gel de poliacrilamida al 8% coloreado con plata permite distinguir los linajes de *T. cruzi* distribuidos en 3 haplogrupos: Haplogrupo A, que agrupa las cepas correspondientes al linaje I; haplogrupo C, que agrupa las cepas correspondientes al linaje IIb. Los perfiles de restricción para este gen posibilitan la identificación de un nuevo linaje en *T. cruzi*, llamado *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2006), correspondiente al haplogrupo B. Sin embargo, este marcador no diferencia las cepas del linaje *T. cruzi* III (linajes IIa y IIc) y las cepas híbridas (linajes IId y IIe), pues ellas presentan el mismo perfil de restricción. Como patrón de comparación de los RFLP's fueron utilizados DNAs de cepas características del linaje *T. cruzi* I (Cepa Colombiana, Haplogrupo A), *T. cruzi* II (Cepa Y, Haplogrupo C) y del linaje *T. cruzi* híbrido (Cepa CL Brener, Haplogrupo B).

4.4.4 Amplificación de loci de microsatélites. Se realizó la amplificación de varios microsatélites con el fin de determinar la naturaleza clonal de los parásitos detectados directamente de los tejidos y de las cepas utilizadas como controles. Estos microsatélites estaban compuestos por repeticiones dinucleótídicas (microsatélite SCLE10), trinucleótídicas (microsatélites TAC15, y TAT20) y un locus compuesto por repeticiones de tetranucleótidos (microsatélite AAAT6) de *T. cruzi*, y se genotipificaron utilizando nuevamente una estrategia de “Full-nested PCR”. Para esto se realizaron dos amplificaciones independientes con dos pares de iniciadores distintos, la primera utilizando un par de iniciadores externos y la segunda con iniciadores internos a la primera secuencia amplificada. Las secuencias de los iniciadores están descritas en la tabla 4. En todos los casos, uno de los dos iniciadores internos fue marcado con fluoresceína en el extremo 5'. Estos ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética Bioquímica de la Universidad federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil).

Cada PCR fue realizada en un volumen final de 15 µL conteniendo 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2,5mM MgCl₂, 0,5U Taq DNA Polimerasa (Promega, USA), 250mM de cada dNTP, 0,3mM de cada iniciador (internos o externos) y 3 µL de DNA total. La amplificación fue realizada en un termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando el siguiente programa de amplificación: denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, anillamiento a 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y denaturación a 94°C por 30 segundos. A cada cinco ciclos de amplificación la temperatura de anillamiento fue disminuida para 55, 53, 51 y 48°C. A esta última temperatura el número de ciclos fue aumentado a 15, seguido por una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para la determinación del tamaño de los microsatélites un volumen de 1 a 3 µl de los productos amplificados para cada uno de los microsatélites fueron denaturados a 90°C por 3 minutos y sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% denaturante (urea 8M) en buffer TBE 1X a 45°C, en el secuenciador automático de

DNA A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia-LKB). En este sistema, los productos fluorescentes generados por la amplificación son excitados por un rayo láser y la fluorescencia es captada por detectores acoplados. La fluorescencia emitida fue entonces leída en forma de curva (pico) a partir de los electroferogramas generados y analizada a través del programa AlleleLocator versión 1.03 (Amersham Pharmacia Biotech). Como patrón externo de las corridas electroforéticas, se utilizó el marcador de peso Sizer 50-500 (Pharmacia-LKB) el cual contiene una mezcla de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares variando de 50 en 50pb, en concentración de 5fmol por fragmento. Adicionalmente en cada carril, incluyendo aquellos conteniendo los patrones externos, fueron adicionados fragmentos fluorescentes de tamaños conocidos (75, 155, 210 y 320pb) que se utilizaron como patrones internos en las corridas.

Tabla 4. - Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de los microsatélites

Iniciador	Secuencia
SCLE10-forward	5'-GATCCCGCAATAGGAAAC-3'
SCLE10-reverse	5'-Fluoresceína-GTGCATGTTCCATGGCTT-3'
TcTAC15-forward	5'-Fluoresceína-GAATTTCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-reverse	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-forward	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-reverse	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-forward	5'-Fluoresceína-GATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-reverse	5'-CAAATTCCTAACGCAGCAGC-3'
TcTAT20ex-forward	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-reverse	5'-CGGCGGTCTTCTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-forward	5'-Fluoresceína-GCCGTGTCTTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-reverse	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-forward	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-reverse	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'

4.4.6 Obtención de perfiles de kDNA por LSSP-PCR. Para la reacción de LSSP-PCR (Low Stringency single Specific Primer-Polimerase Chain Reaction), 20 μ L del producto de la amplificación del fragmento de 330 pb correspondiente al kDNA de *T. cruzi* fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (1% agarosa LE, 0.5% agarosa Low Melting Point), por 2 horas a 80V. La cámara de electroforesis utilizada fue previamente tratada con HCl 1M e NaOH 1M para eliminar cualquier presencia de ADN contaminante que pudiera interferir en la reacción de amplificación. Después de la electroforesis, los productos amplificados fueron visualizados en un transiluminador UV de longitud de onda larga, escindidos del gel y transferidos a un tubo de 1.5 ml estéril. Estas muestras fueron fundidas en baño maría a 95°C y diluidas en una proporción de 1:10 en agua desionizada estéril.

La reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 10 μ l conteniendo 10 mM de Tris-HCl pH 8.5, 80mM de KCl, 1.5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 45 pmoles del iniciador S35G (3'-ATG TAC GGG GGA GAT GCA TGA-5') marcado o no con fluoresceína en el extremo 5', 1,6U de Taq Polimerasa (Promega, USA) junto con 2 μ l de muestra (fragmento de 330 pb diluido 1:10). La amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 30°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Un volumen de 5 μ l de los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 8% en buffer TBE 1X por aproximadamente 4 horas a 100 V, y posteriormente coloreada con plata. Se determinó la presencia de las bandas basados en su reproducibilidad, resolución e intensidad.

Un volumen de 3 μ l de los productos de amplificación obtenidos con el iniciador S35G marcado con fluoresceína fueron denaturados y corridos en un gel de poliacrilamida al 6% denaturante en el secuenciador automático de DNA A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia-LKB). Los datos obtenidos fueron analizados a través

del programa AlleleLocator versión 1.03 (Amersham Pharmacia Biotech), tal como se realizó con el análisis de los microsatélites.

4.4.7 Secuenciación de DNA de *T. cruzi* a partir de tejidos. Con el fin de determinar el grado de similitud genética de los parásitos detectados en los tejidos con las cepas ya reportadas en distintas bases de datos informáticas, se realizó una secuenciación de DNA a partir de los productos amplificados del gen mini-exon provenientes de los tejidos positivos para *T. cruzi*. Estos amplificados fueron purificados y remitidos para su secuenciación por la metodología de extensión de iniciador (Macrogen, Korea) en el secuenciador ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). Posteriormente las secuencias obtenidas de los parásitos presentes en los tejidos fueron comparadas con aquellas incluídas en las bases de datos del NCBI (NIH, USA) por medio del programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) con la opción “nucleotide BLAST” y utilizando el algoritmo “BLASTn”. Seguidamente se determinaron los valores de similitud para cada secuencia en términos de identidad. También se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas de los tejidos utilizando el software ClustalW2.

4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

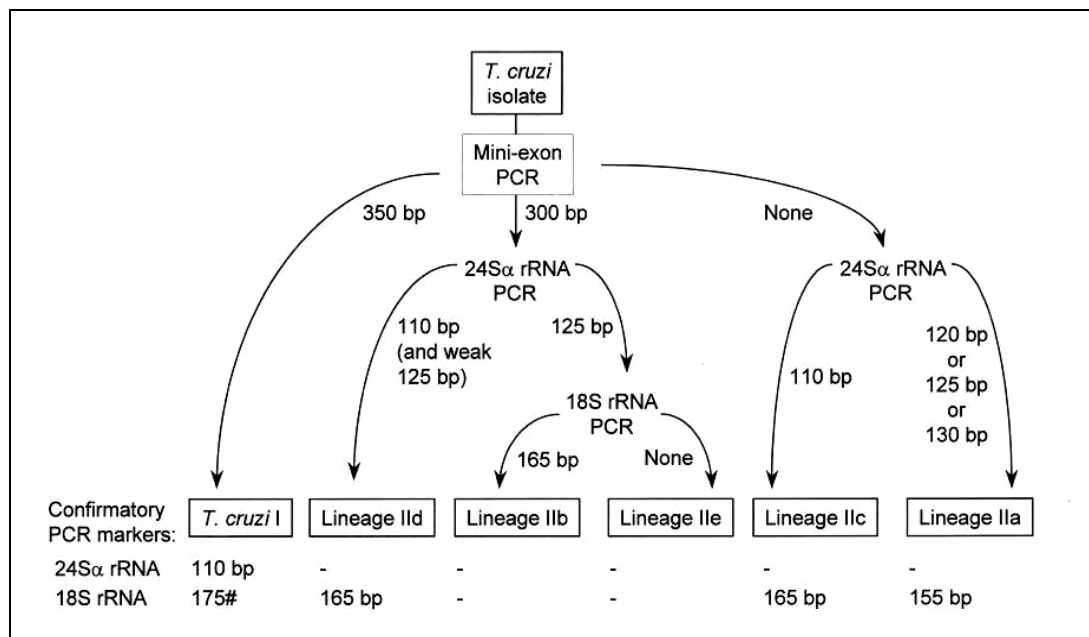
4.5.1 Clasificación molecular de *T. cruzi*. Las diferentes muestras de tejidos y las cepas de *Trypanosoma cruzi* fueron clasificadas en uno de los 6 diferentes linajes de *T. cruzi* dependiendo de los resultados de las PCR para rRNA, mini-exon y posteriormente analizando el polimorfismo en el gen mitocondrial *COII* (Tabla 5, Figura 11). Adicionalmente se determinaron los perfiles de LSSP-PCR a partir de los parásitos detectados en los tejidos, DNA de sangre y cepas del parásito, teniendo en cuenta que los fragmentos amplificaran de una manera reproducible e indudable. Se calculó el tamaño aproximado de las bandas para cada PCR utilizando el programa PhotoCaptMw versión 10.01.

Tabla 5. Identificación de los distintos linajes y sublinajes de *T. cruzi*.

Linaje	mini-exon	24s rRNA	18s rRNA	Haplogrupo <i>COII</i>
<i>T. cruzi</i> I	350 pb	110 pb	175 pb*	A
<i>T. cruzi</i> IIa	NA	120,125,130	155 pb	-
<i>T. cruzi</i> IIb	300 pb	pb	165 pb	C
<i>T. cruzi</i> IIc	NA	125 pb	165 pb	B
<i>T. cruzi</i> IId	300 pb	110 pb	165 pb	B
<i>T. cruzi</i> IIe	300 pb	110 pb/125 pb	NA	B

NA: No amplifica. * Pueden producirse amplificaciones de bandas de 160, 170 y 180 pb.

Figura 11. Identificación de *T. cruzi* utilizando rRNA 24S, rRNA 18S y mini-exon.



Fuente: Brisse *et al.*, 2001.

4.5.2 Análisis de los perfiles de kDNA por LSSP-PCR. Las bandas obtenidas mediante la técnica LSSP-PCR con las diferentes muestras de tejidos y parásitos se utilizaron para construir una matriz binaria de acuerdo a la presencia o no de las bandas para cada muestra, designando un valor de “1” a la presencia y de “0” a la ausencia de las bandas. El análisis de los patrones de bandas se llevó a cabo en dos pasos: primero un análisis vertical y después un análisis horizontal.

Para el análisis vertical se utilizó el software DNA-POP (Pena & Nunes, 1990). DNA-POP basa su análisis en la división vertical del gel en niveles de movilidad. Un nivel es definido por la presencia de por lo menos una banda en cualquier carril del gel. El gel es entonces analizado y cuando una banda es encontrada, definiendo así un nivel, el número de carril o carriles donde se encuentra la banda es ingresado al programa. Después de computar todas las bandas, el programa calcula la proporción de bandas compartidas entre n muestras corridas en un mismo gel en $n(n-1)/2$ comparaciones de pares, basándose en $S=2nXY/(nX+nY)$, donde nX y nY es el número de bandas en las muestras X y Y, y nXY es el número de bandas compartidas entre las muestras X y Y.

El análisis horizontal se llevo a cabo utilizando el software TREECON versión 1.3b (Van de Peer *et al.*, 1994). Los datos fueron sometidos al método RFLP/AFLP/RAPD utilizando el algoritmo de Nei & Li (1979) para determinar las distancias genéticas, según metodología previamente descrita para el análisis de este tipo de datos en el análisis de parásitos de la familia *Trypanosomatidae* (Schönian *et al.*, 2000; Rotureau *et al.*, 2006). Para la construcción de los dendrogramas se utilizó el método de UPGMA (del inglés, *Unweighted Pair Group Method, arithmetic Average*). En el UPGMA, las medidas de las distancias genéticas (d) son computadas para todos los pares de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), correspondientes a cada muestra. El agrupamiento de las

OTUs se inicia a partir de las 2 OTUs que presentan el menor valor de distancia. Estas dos son combinadas como si fuesen una única OTU. Nuevas distancias son calculadas entre la nueva OTU combinada y las demás utilizando la media aritmética de las distancias; de nuevo, las dos OTUs con menor distancia son combinadas y el proceso continúa hasta que todas las unidades hayan sido analizadas. Los árboles fueron construidos siguiendo la opción “clustering” por el método UPGMA y visualizado en la interfase del propio programa. La distribución de cada muestra en los dendrogramas se relacionó con el genotipo correspondiente y con las manifestaciones clínicas e histopatológicas propias de cada muestra.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, la presente investigación es clasificada sin riesgo ya que no se realizaron intervenciones directamente a los pacientes dado que las muestras utilizadas son muestras de archivo (provenientes de cadáveres) de los laboratorios de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, regional Nororiental. Adicionalmente no se suministró información de los individuos de los cuales se tomaron los tejidos, dado que la información obtenida provino del análisis de los parásitos presentes en estas muestras y no de los tejidos mismos del paciente. Se tomó consentimiento informado de los pacientes a los cuales se les extrajeron las muestras de sangre periférica. Las muestras utilizadas como control corresponden a cepas de referencia de *T. cruzi* y a la colección de parásitos existentes en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad Industrial de Santander. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

5. RESULTADOS

5.1 DETECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN TEJIDOS DE PACIENTES

5.1.1 Detección del DNA de *T. cruzi*. Con el objetivo de detectar las poblaciones de *T. cruzi* presentes en los diferentes tejidos humanos, se analizaron por PCR muestras de tejido cardíaco, muestras de esófago y colon provenientes de pacientes cardiopatas. De los 50 tejidos analizados, correspondientes a 45 pacientes con hallazgos patológicos compatibles con enfermedad de Chagas fue posible detectar por PCR el nDNA y kDNA de *T. cruzi* en 12 tejidos (24,4%) de 11 pacientes. De estos 12 tejidos positivos por PCR, 11 correspondieron a tejido cardíaco y en un paciente (paciente 4) se detectó el DNA de *T. cruzi* tanto en tejido cardíaco como en esófago. En las muestras de colon analizadas no se demostró la presencia del parásito. Las muestras de tejidos control provenientes de pacientes con cardiomiopatía no chagásica fueron negativos en todos los ensayos realizados. El porcentaje de detección del parásito fue similar usando como blanco el DNA nuclear o el del kinetoplasto. Los resultados de la detección se muestran en la tabla 6.

5.1.2 Análisis histológico de los tejidos. La mayoría de los 50 tejidos analizados presentaron cuadros de infiltrado inflamatorio severo, asociados a miocarditis. El análisis histológico convencional de los 12 tejidos positivos para *T. cruzi* mostró un predominio de miocarditis, con cuadros inflamatorios de diferentes intensidades asociados a fibrosis. La severidad del cuadro inflamatorio producido en los tejidos se asoció con la presencia de amastigotes en el análisis histológico. En 6 de los 12 tejidos se pudieron encontrar cuadros necróticos e inflamatorios severos, asociados a la presencia de nidos de parásitos; los otros 6 tejidos, mostraron cuadros inflamatorios de menor intensidad acompañados de fibrosis leve y no se observaron nidos de parásitos. No se detectó la presencia del

parásito en el análisis microscópico de los tejidos que fueron negativos para la PCR. En la muestra de esófago positiva por PCR (B-06) no se encontraron signos de destrucción masiva del tejido y aunque en este paciente no fueron encontrados signos de megalias visibles, histológicamente se encontraron infiltrados de intensidad moderada con pequeñas regiones de fibrosis en la capa muscular (Figura 12). Los principales hallazgos histológicos observados en los tejidos infectados por *T. cruzi* se muestran en la tabla 7.

Tabla 6. Detección de nDNA y kDNA de *T. cruzi* en tejidos de pacientes

Paciente	Muestra	Tejido	nDNA (TCZ1-2)	kDNA (S35-36)	Paciente	Muestra	Tejido	nDNA (TCZ1-2)	kDNA (S35-36)
1	B-01	Corazón	188 pb	330 pb	26	B-31	Corazón	NA	NA
2	B-02	Corazón	188 pb	330 pb	27	B-32	Corazón	188 pb	330 pb
3	B-03	Corazón	188 pb	330 pb	28	B-33	Corazón	NA	NA
4	B-04	Corazón	188 pb	330 pb	29	B-34	Corazón	188 pb	330 pb
	B-05	Colon	NA	NA	30	B-35	Corazón	NA	NA
	B-06	Esófago	188 pb	330 pb	31	B-36	Corazón	NA	NA
5	B-07	Corazón	188 pb	330 pb	32	B-37	Corazón	NA	NA
6	B-08	Corazón	188 pb	330 pb	33	B-38	Corazón	NA	NA
7	B-09	Corazón	188 pb	330 pb	34	B-39	Corazón	NA	NA
8	B-10	Corazón	NA	NA	35	B-40	Corazón	NA	NA
9	B-11	Corazón	188 pb	330 pb	36	B-41	Corazón	NA	NA
10	B-12	Corazón	NA	NA	37	B-42	Corazón	NA	NA
11	B-13	Corazón	NA	NA	38	B-43	Corazón	NA	NA
12	B-14	Corazón	NA	NA	39	B-44	Corazón	NA	NA
13	B-15	Corazón	NA	NA	40	B-45	Corazón	NA	NA
14	B-16	Corazón	188 pb	330 pb	41	B-46	Corazón	NA	NA
15	B-17	Corazón	NA	NA	42	B-47	Corazón	NA	NA
16	B-18	Corazón	NA	NA	43	B-48	Corazón	NA	NA
17	B-19	Corazón	NA	NA	44	B-49	Corazón	NA	NA
18	B-20	Corazón	NA	NA	45	B-50	Corazón	NA	NA
	B-21	Esófago	NA	NA	46	C-01	Corazón	NA	NA
19	B-22	Corazón	NA	NA	47	C-02	Corazón	NA	NA
20	B-23	Corazón	NA	NA	48	C-03	Corazón	NA	NA
21	B-24	Corazón	NA	NA	49	C-04	Corazón	NA	NA
22	B-25	Corazón	NA	NA	50	C-05	Corazón	NA	NA
23	B-26	Corazón	NA	NA	51	C-06	Corazón	NA	NA
	B-27	Esófago	NA	NA	52	C-07	Corazón	NA	NA
	B-28	Colon	NA	NA	53	C-08	Corazón	NA	NA
24	B-29	Corazón	NA	NA	54	C-09	Corazón	NA	NA
25	B-30	Corazón	NA	NA	55	C-10	Corazón	NA	NA

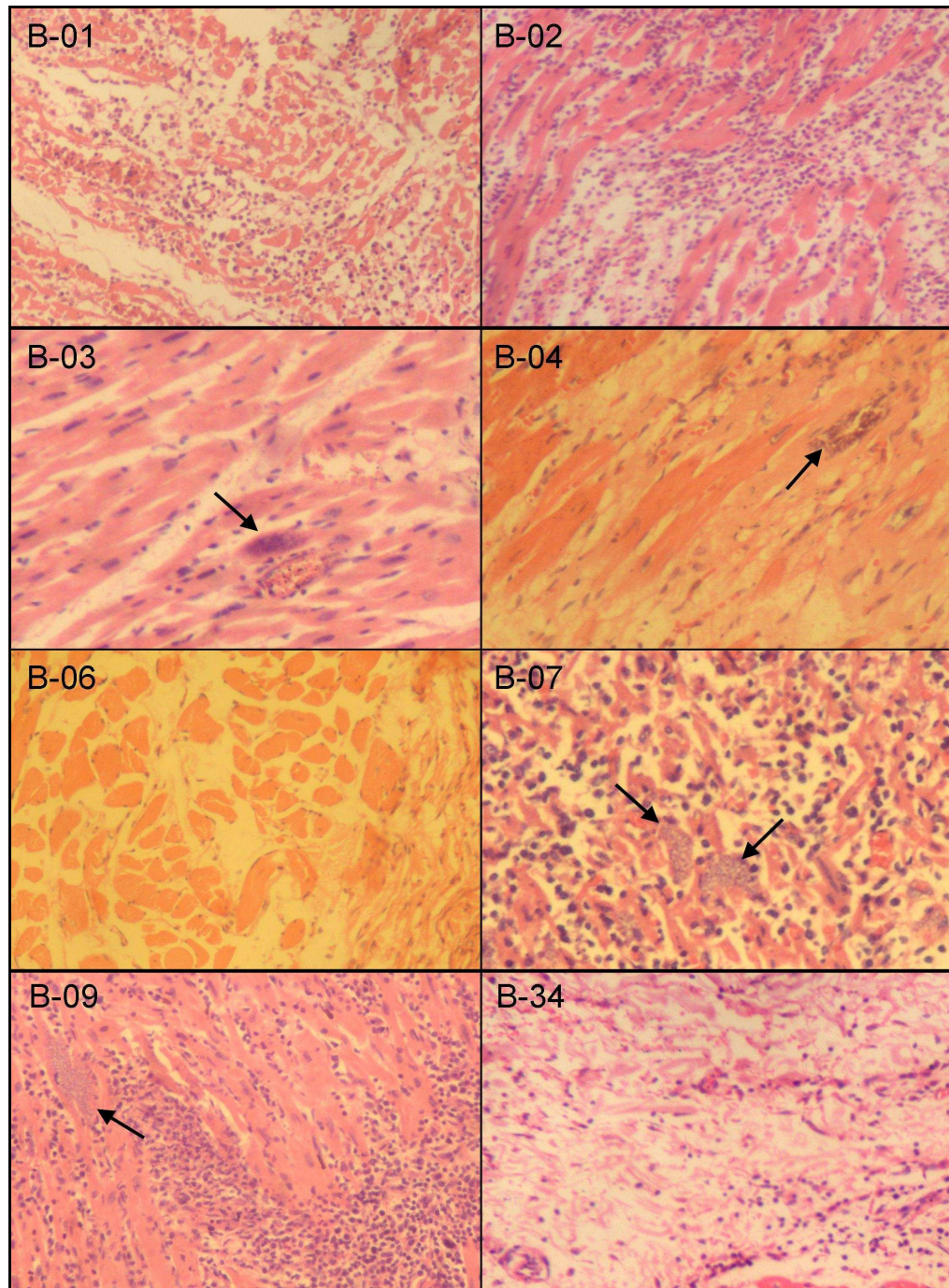
Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases. NA: No amplificó

Tabla 7. Hallazgos histológicos en tejidos infectados con *T. cruzi*.

Paciente	Muestra	Tejido	Nidos de amastigotes	Agresión a fibras musculares	Infiltrado Linfo-histiocitario	Fibrosis focal	Hipertrofia difusa	Descripción general
1	B-01	Corazón	+	+++	+++++	-	-	Cuadro muy severo de necrosis e inflamación
2	B-02	Corazón	+	+++	+++++	-	-	Cuadro muy severo de necrosis e inflamación
3	B-03	Corazón	++	++	+++	++	+	Cuadro inflamatorio severo
4	B-04	Corazón	+	+	+	+++	++	Fibrosis marcada con inflamación leve
	B-06	Esófago	-	+	+	+	-	Fibrosis e inflamación leve
5	B-07	Corazón	+++++	+++++	+++++	-	-	Cuadro muy severo de necrosis e inflamación
6	B-08	Corazón	-	-	-	+	-	Ausencia total de inflamación, necrosis y amastigotes
7	B-09	Corazón	+++++	+++++	+++++	-	-	Cuadro muy severo de necrosis e inflamación
9	B-11	Corazón	-	+	+	++	++	Fibrosis e inflamación leve
14	B-16	Corazón	-	+	+	+	+	Fibrosis e inflamación leve
27	B-32	Corazón	-	+	+	+	-	Fibrosis e inflamación leve
29	B-34	Corazón	+	+++	+++++	-	-	Cuadro muy severo de necrosis e inflamación

La escala de severidad se muestra en cruces. +: Escaso; ++: moderado; +++: marcado; ++++: severo.

Figura 12. Análisis histológico en tejidos infectados con *T. cruzi*.



B-01 y B-02) Inflamación severa, necrosis. B03) Inflamación moderada y nido de amastigotes (flecha negra). B04) Fibrosis y escaso infiltrado inflamatorio, nido de amastigotes. B06) Mínimo infiltrado y fibrosis discreta. B07 y B09) Inflamación severa, necrosis y nidos de amastigotes. B34) Fibrosis y escaso infiltrado inflamatorio.

5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

5.2.1 Caracterización de los genes del rRNA 24S, rRNA 18S y mini-exon. Las cepas de referencia y aislados de *T. cruzi* utilizados en el estudio se caracterizaron genéticamente y se clasificaron en cada uno de los 6 subgrupos de *T. cruzi* descritos por Brisse *et al.* (2001). Los resultados de la amplificación de los genes del rRNA 24S, rRNA 18S y mini-exon fueron concordantes con los ya publicados para cada una de las cepas. Los aislados obtenidos recientemente por nuestro grupo, provenientes de un paciente con cardiopatía chagásica crónica (aislado 338) y un vector (aislado 339) en el departamento de Santander fueron clasificadas como *T. cruzi* I (Tabla 8). Las cepas de *T. rangeli*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania chagasi* y *Crithidia* no amplificaron.

Tabla 8. Caracterización genética de cepas de referencia y aislados de *T. cruzi*.

Parásito	Cepa/Aislado	Mini-exon	24sa rRNA	18s rRNA	Linaje mayor
<i>T. cruzi</i>	338	350 pb	110 pb	175 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	339	350 pb	110 pb	175 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	Santander A	350 pb	110 pb	175 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	Munantá	350 pb	110 pb	175 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	Colombiana	350 pb	110 pb	175 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	Y	300 pb	125 pb	165 pb	<i>T. cruzi</i> IIb
<i>T. cruzi</i>	CL Brener	300 pb	125 pb	NA	<i>T. cruzi</i> IIe
<i>T. cruzi</i>	Silvio X10 cl1	350 pb	110 pb	160 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i>	CBB cl3	300 pb	125 pb	165 pb	<i>T. cruzi</i> IIb
<i>T. cruzi</i>	V195	300 pb	125 pb	NA	<i>T. cruzi</i> IIe
<i>T. cruzi</i>	13379 cl3	350 pb	110 pb	170 pb	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. rangeli</i>	C23	NA	NA	NA	-
<i>Crithidia spp</i>	MS05	NA	NA	NA	-
<i>L. chagasi</i>		NA	NA	NA	-
<i>L. panamensis</i>	LS94	NA	NA	NA	-

Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases. NA: No amplificó.

La caracterización genética de *T. cruzi* presente en los tejidos infectados utilizando los marcadores anteriormente mencionados permitió detectar el linaje *T. cruzi* I en 9 de los 12 tejidos (75%) y en 3 (25%) se identificó el linaje *T. cruzi* IIb. En el paciente con presencia de *T. cruzi* tanto en corazón como en esófago se observó una infección mixta, con *T. cruzi* IIb en miocardio y *T. cruzi* I en esófago. Todos los parásitos caracterizados como *T. cruzi* IIb se encontraron en tejido cardíaco (Tabla 9, Figura 13). La caracterización por medio del rRNA 24S α de los parásitos presentes en sangre periférica de los 7 pacientes chagásicos utilizados como controles para los ensayos de LSSP-PCR, también reveló la presencia de parásitos de los linajes *T. cruzi* I y *T. cruzi* IIb (Tabla 10).

Tabla 9. Caracterización genética de *T. cruzi* presente en tejidos de pacientes chagásicos.

Paciente	Muestra	Órgano	Mini-exon	24S α rRNA	18S rRNA	Haplogrupo COII	Linaje mayor
1	B-001	Corazón	350 pb	110 pb	175 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
2	B-002	Corazón	350 pb	110 pb	175 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
3	B-003	Corazón	300 pb	125 pb	NA	NA	<i>T. cruzi</i> IIb
4	B-004	Corazón	300 pb	125 pb	165 pb	C	<i>T. cruzi</i> IIb
	B-006	Esófago	350 pb	110 pb	175 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
5	B-007	Corazón	350 pb	NA	175 pb	NA	<i>T. cruzi</i> I
6	B-008	Corazón	350 pb	110 pb	175 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
7	B-009	Corazón	300 pb	125 pb	165 pb	NA	<i>T. cruzi</i> IIb
9	B-011	Corazón	350 pb	NA	175 pb	NA	<i>T. cruzi</i> I
14	B-016	Corazón	350 pb	NA	175 pb	NA	<i>T. cruzi</i> I
27	B-032	Corazón	350 pb	110 pb	175 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
29	B-034	Corazón	350 pb	110 pb	NA	NA	<i>T. cruzi</i> I

Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases. NA: No amplificó

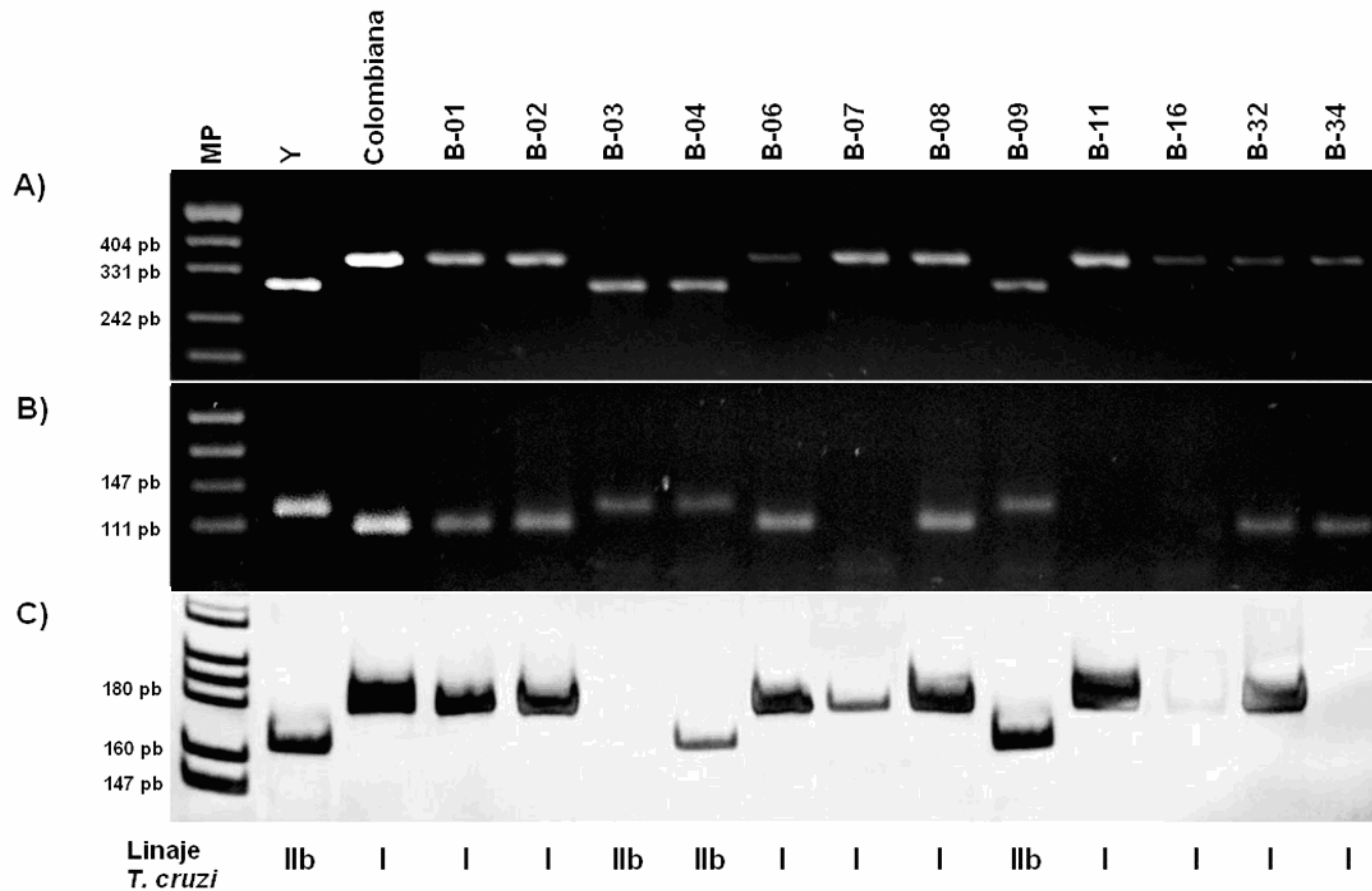
Tabla 10. Caracterización genética de *T. cruzi* presente en sangre periférica de pacientes chagásicos en diferentes estadios.

Estadio Chagas*	Paciente	18S rRNA	24S α rRNA	Haplogrupo COII	Linaje mayor
I	CHS277	NA	125 pb	C	<i>T. cruzi</i> IIb
I	CHS330	165 pb	NA	C	<i>T. cruzi</i> IIb
II	CHS275	165 pb	125 pb	C	<i>T. cruzi</i> IIb
III	CHS023	175 pb	110 pb	A	<i>T. cruzi</i> I
III	CHS295	175 pb	110 pb	NA	<i>T. cruzi</i> I
III	2138	NA	125 pb	C	<i>T. cruzi</i> IIb
IV	CHS016	175 pb	110 pb	NA	<i>T. cruzi</i> I

Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases. NA: No amplificó. *: Clasificación clínica y electrocardiográfica de la enfermedad de Chagas en estadios según la OMS-OPS (Anexo A).

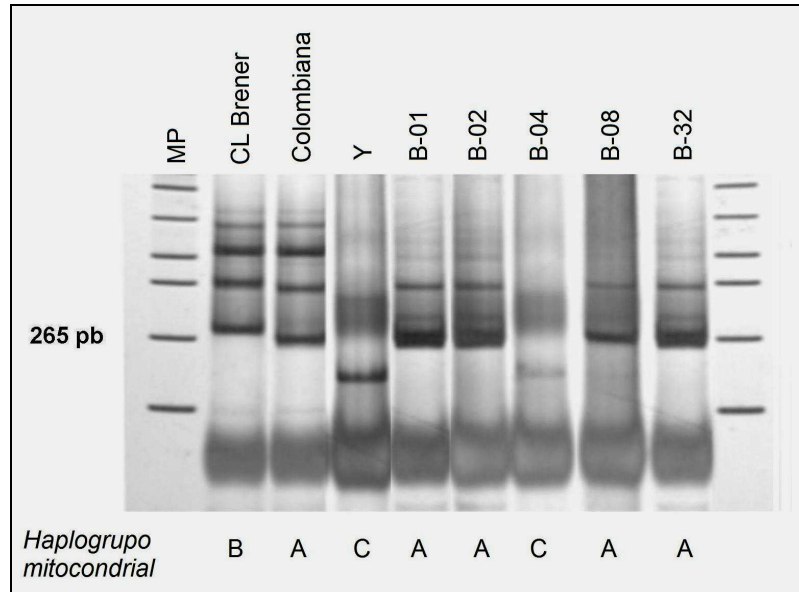
5.2.2 Análisis del polimorfismo del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa II. El análisis del polimorfismo en el gen mitocondrial *COII* confirmó los genotipos de *T. cruzi* obtenidos con los otros marcadores utilizados anteriormente en los tejidos y aunque no en todas las muestras se obtuvo amplificación exitosa de este gen se corroboró que varios de los tejidos con perfiles correspondientes a *T. cruzi* I presentan el patrón A (linaje ancestral *T. cruzi* I) y los *T. cruzi* IIb presentan el patrón C (linaje ancestral *T. cruzi* II). El nivel de detección del ensayo de “full nested PCR” aplicado a los tejidos fue bajo, por lo tanto no permitió corroborar todos los genotipos encontrados (Tabla 9, Figura 14). En sangre periférica también se identificaron los genotipos *T. cruzi* I y *T. cruzi* IIb definidos por los demás marcadores moleculares (Tabla 10).

Figura 13. Caracterización genética de *T. cruzi* presente en tejidos de pacientes chagásicos mediante el análisis de los genes del mini-exon, rRNA24S y rRNA 18s.



A) Electroforesis en gel de agarosa mostrando las amplificaciones del gen mini-exon; B) Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación del gen 24S α rRNA; C) Electroforesis en gel de poliacrilamida mostrando la amplificación del gen 18S rRNA. Como controles Internos de amplificación se utilizaron las cepas Y y Colombiana de *T. cruzi*. MP: A y C, marcador de peso molecular pUC19/Msp HpaIII (Fermentas); C, marcador de peso molecular pBR322 DNA-MspI (New England Biolabs).

Figura 14. Caracterización de *T. cruzi* en tejidos de pacientes con cardiopatía chagásica, mediante el análisis del gen *COII*. Se muestran los haplogrupos correspondientes a cada muestra.



MP: Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen).

5.2.3 Amplificación de microsatélites polimórficos. La amplificación y tipificación de 4 microsatélites polimórficos en los tejidos y parásitos utilizados como control permitieron determinar la naturaleza clonal de los parásitos detectados. Los resultados de la caracterización de los aislados 338 y 339 provenientes de Santander permitieron establecer la policlonalidad del aislado 338 con el marcador SCLE10 (4 alelos diferentes) y la monoclonalidad del aislado 339, proveniente de vector (Tabla 11).

El análisis de microsatélites no dio resultados todos los tejidos, debido a que el DNA aislado de los tejidos posee una menor calidad y cantidad que el DNA obtenido a partir de sangre o tejidos frescos. En los parásitos presentes en los tejidos se observaron uno o máximo dos alelos para cada uno de los locus analizados. Considerando a *T. cruzi* como un organismo diploide, estos resultados fueron interpretados como poblaciones homogéneas o monoclonales (1 pico) o

heterocigotos (2 picos) para cada locus (Tabla 12). Los fragmentos producidos por la amplificación específica del microsatélite TAC15 presentaron tamaños similares en todos los tejidos en donde se había detectado *T. cruzi* I, con un alelo de 96 pb mientras uno de los tejidos en donde previamente se había detectado *T. cruzi* II presentó un alelo de 99 pb. Las figuras 15, 16 y 17 muestran los electroferogramas obtenidos para cada uno de los microsatélites. No se obtuvo amplificación del microsatélite SCLE10 en las muestras de los tejidos.

Tabla 11. Tipificación por microsatélites de cepas y aislados de *T. cruzi*.

Parásito	Cepa/clon	SCLE10	TAC15	TAT20	AAAT6
<i>T. cruzi</i>	338	239/255/261/275	NA	181/223	255/255
<i>T. cruzi</i>	339	255/255	96/96	181/181	255/255
<i>T. cruzi</i>	Munantá	NA	NA	NA	255/255
<i>T. cruzi</i>	Y	273/273	99/99	190/208	NA
<i>T. cruzi</i>	CL Brener	239/275	129/141	181/223	263/263
<i>T. cruzi</i>	CBB cl3	239/275/291	99/132	181/223	259/271/275
<i>T. cruzi</i>	V195	239/275	129/141	181/223	263/263
<i>T. cruzi</i>	13379 cl3	251/255	NA	NA	NA

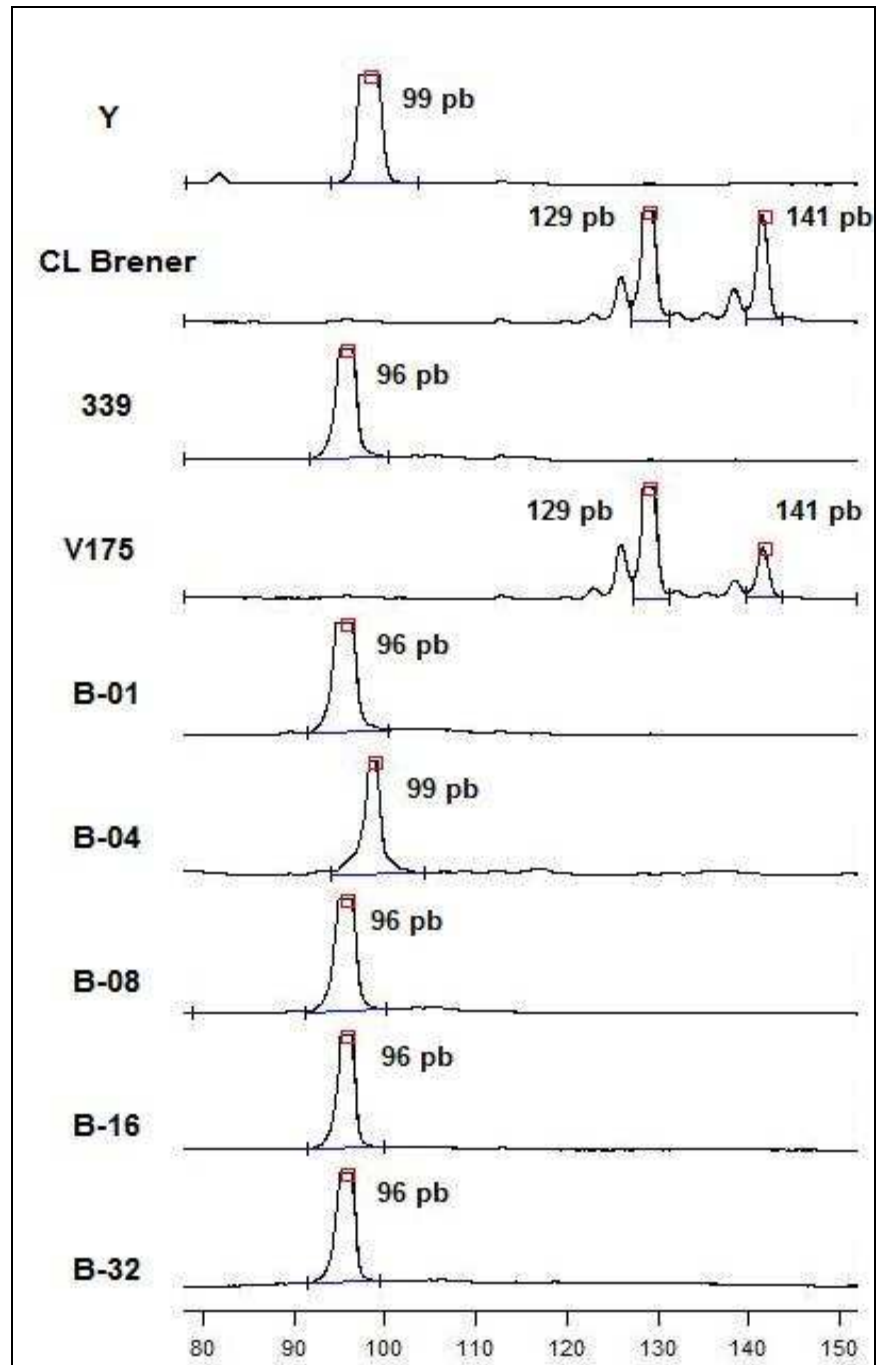
Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases. NA: No amplificó

Tabla 12. Tipificación por microsatélites de *T. cruzi* en tejidos de pacientes chagásicos

Paciente	Muestra	Órgano	SCLE10	TAC15	TAT20	AAAT6
1	B-001	Corazón	NA	96/96	181/181	NA
2	B-002	Corazón	NA	NA	181/181	NA
3	B-003	Corazón	NA	NA	NA	NA
4	B-004	Corazón	NA	99/99	187/187	NA
	B-006	Esófago	NA	NA	187/187	NA
5	B-007	Corazón	NA	NA	187/187	NA
6	B-008	Corazón	NA	96/96	187/187	275/275
7	B-009	Corazón	NA	NA	NA	NA
9	B-011	Corazón	NA	NA	190/190	NA
14	B-016	Corazón	NA	96/96	187/187	NA
27	B-032	Corazón	NA	96/96	181/187	NA
29	B-034	Corazón	NA	NA	187/187	255/275

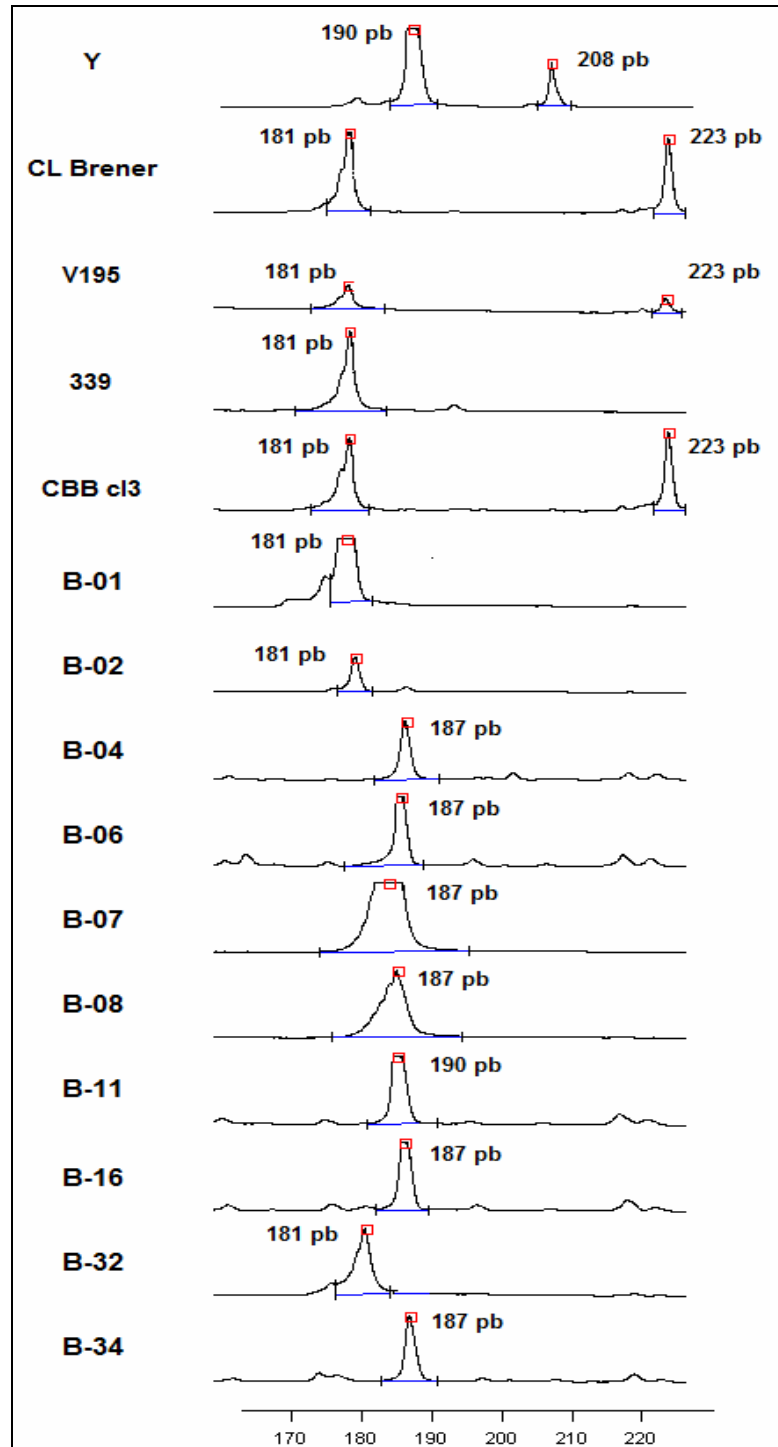
Los tamaños de los alelos se muestran en pares de bases (pb). NA: No amplificó

Figura 15. Electroferogramas del microsatélite TAC15 en cepas de *T. cruzi* y en tejidos de pacientes chagásicos.



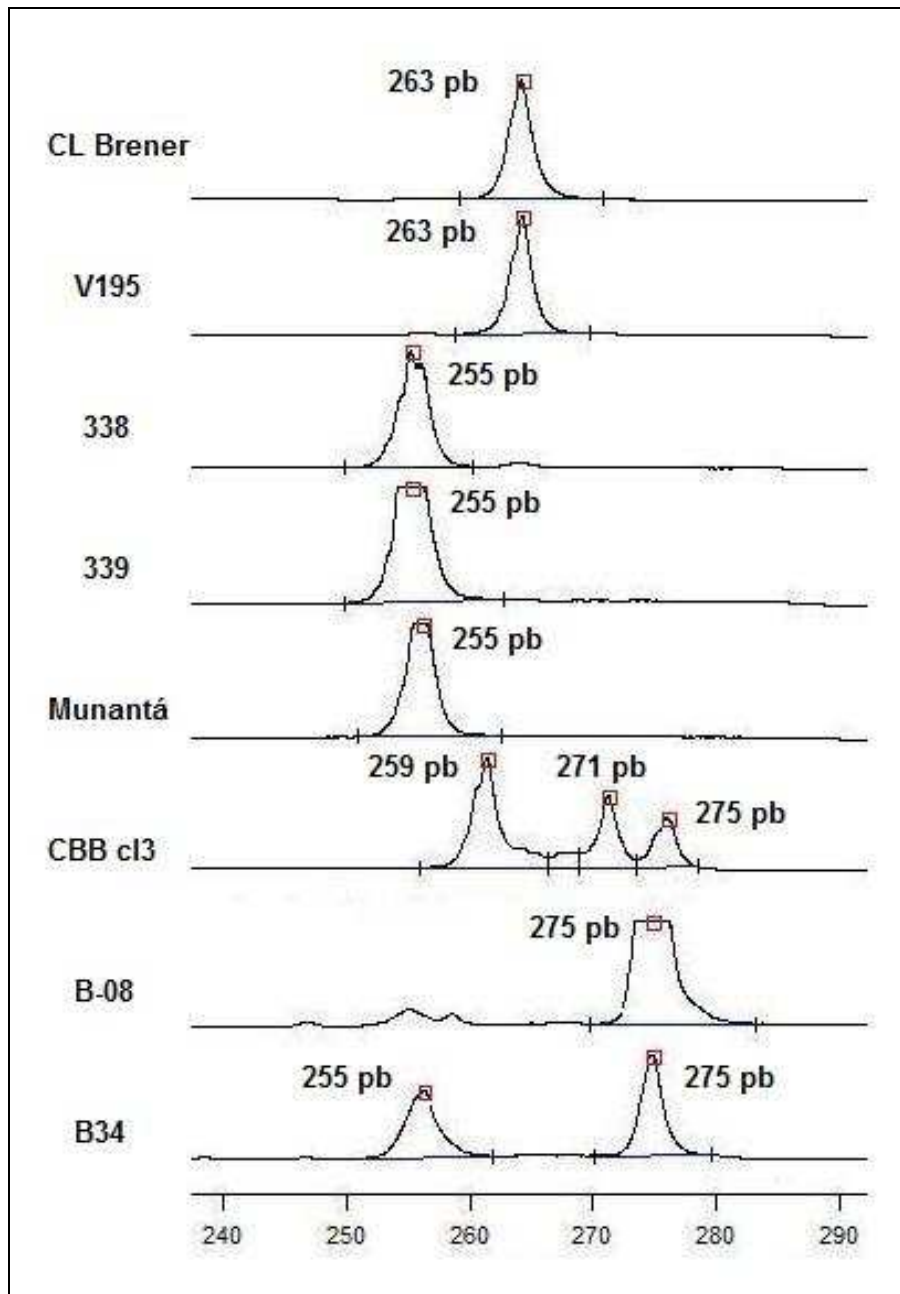
Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases.

Figura 16. Electroferogramas del microsatélite TAT20 en cepas de *T. cruzi* y en tejidos de pacientes chagásicos.



Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases.

Figura 17. Electroferogramas del microsatélite AAAT6 en cepas de *T. cruzi* y en tejidos de pacientes chagásicos.



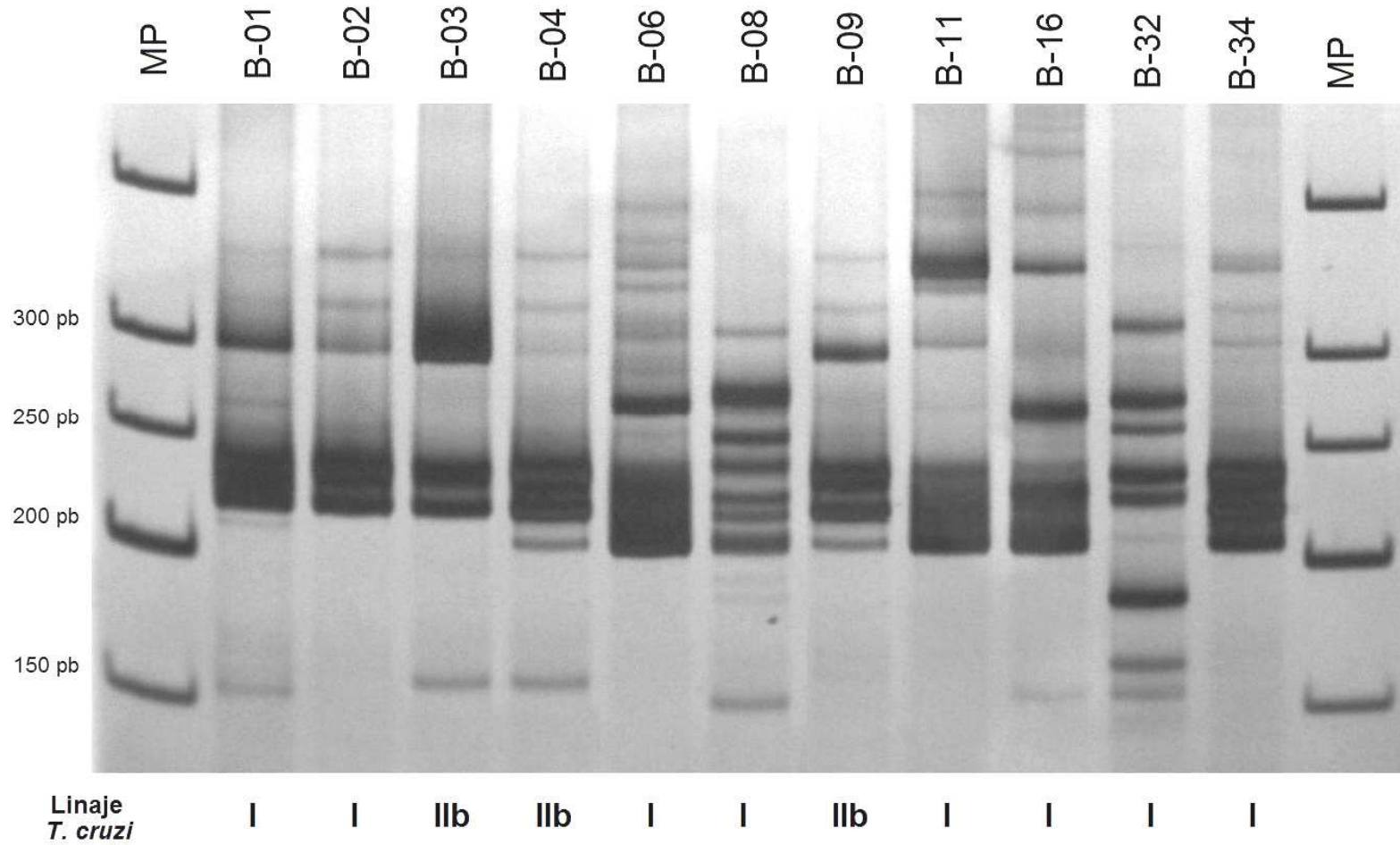
Pb: Tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases.

5.2.4 Perfiles de kDNA por LSSP-PCR y LSSP-PCR fluorescente. Los perfiles específicos del kDNA de los parásitos presentes en cada una de las muestras estudiadas, se obtuvieron mediante la técnica de LSSP-PCR. Los parásitos utilizados como control, los tejidos y las muestras de sangre fueron exitosamente tipificados utilizando esta técnica obteniéndose perfiles únicos para cada uno de los parásitos detectados.

Once de los doce tejidos positivos para *T. cruzi* mostraron perfiles de kDNA claramente visibles y definidos, sin embargo la muestra B-07 no produjo un perfil con la intensidad adecuada, por lo tanto fue excluido de los análisis de LSSP-PCR. Aunque los perfiles resultantes fueron únicos para todos los tejidos, se observaron algunas similitudes en cuanto al número y al tamaño de las bandas (muestras B-01 B-02, B-03 y B-04). Los perfiles de las muestras B-08 y B32 mostraron una complejidad más alta con respecto a los demás, reflejados en un mayor número de bandas (Figura 18). Los perfiles de kDNA presentes en los dos tejidos del paciente con infección mixta (paciente 4, tejidos B-04 y B-06) fueron totalmente distintos. Al comparar los perfiles obtenidos de los parásitos control (cepas y aislados), sangre periférica y tejidos infectados no se observaron diferencias marcadas entre ellos (Figuras 18 y 19).

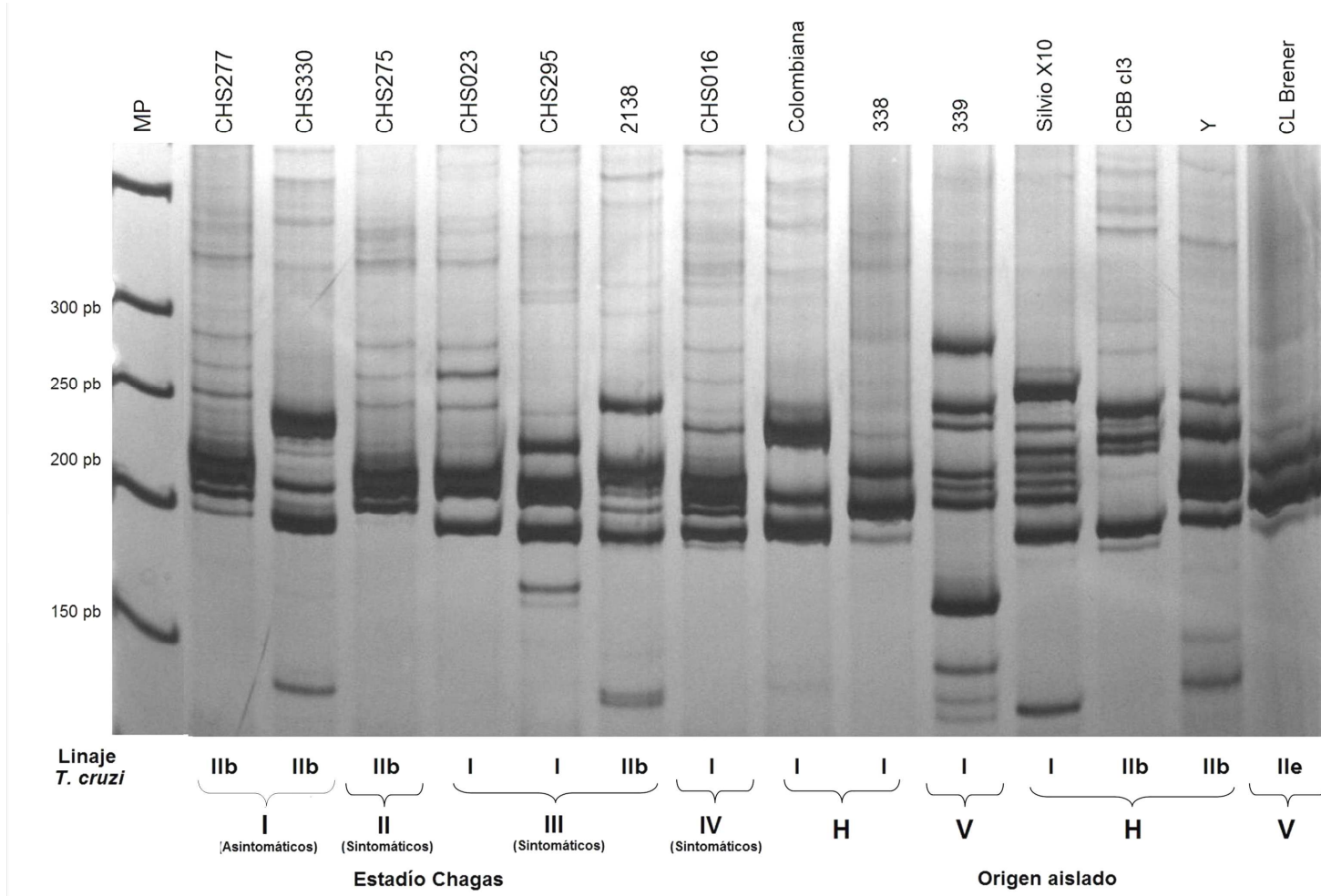
Un segundo análisis, empleando el iniciador S35G marcado con fluoresceína, mostró concordancia con los resultados obtenidos para los parásitos control y los tejidos cuando se utilizó el iniciador no marcado. La Figura 20 muestra los electroferogramas obtenidos utilizando el iniciador S35G marcado. Es de resaltar la reproducibilidad de los ensayos de LSSP-PCR, pues de 3 ensayos independientes realizados a los mismos tejidos los perfiles resultantes fueron idénticos.

Figura 18. Perfiles de LSSP-PCR obtenidos de los tejidos de pacientes con cardiopatía chagásica



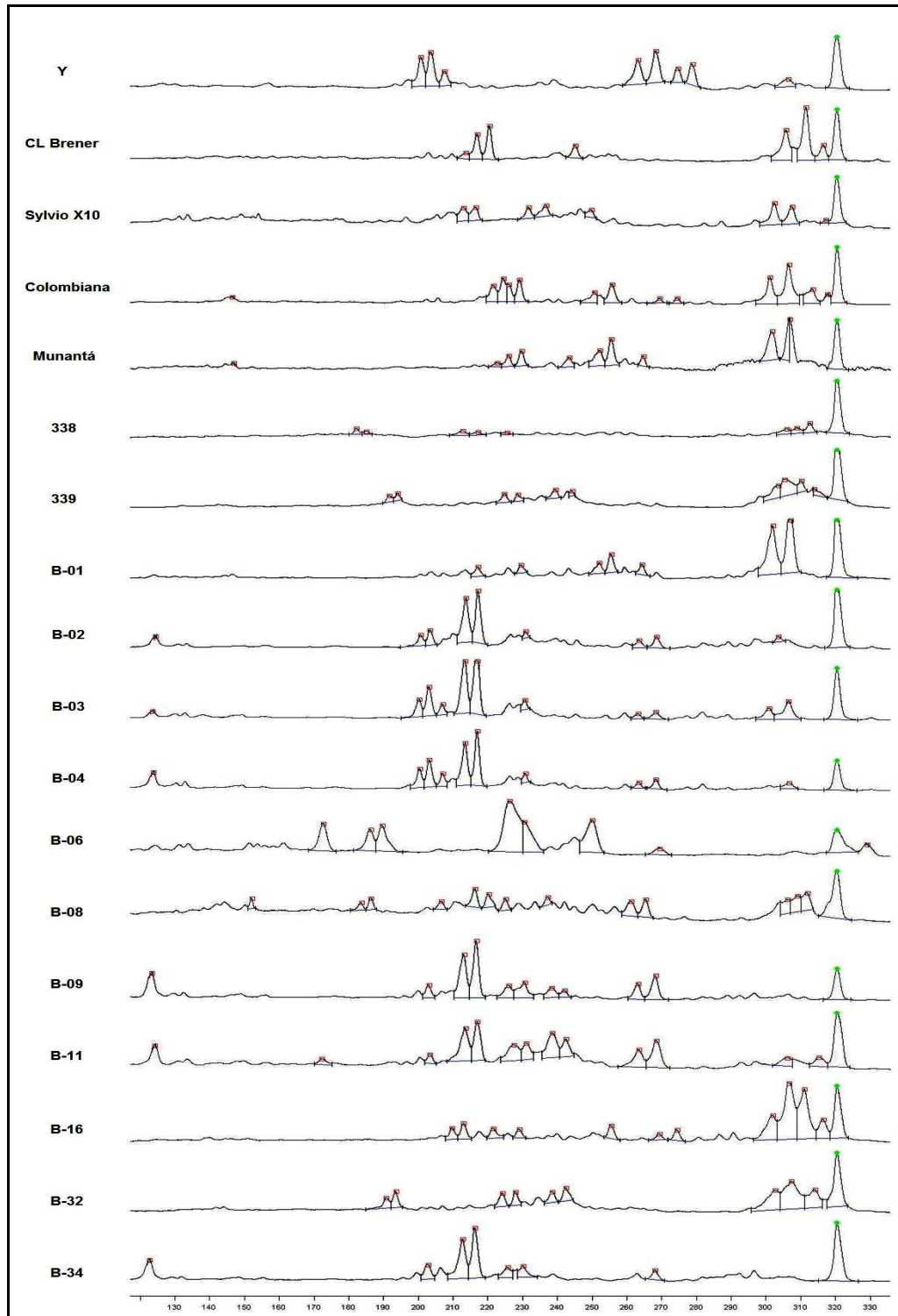
MP: Marcador de peso 50 bp Gene Ruler (Fermentas).

Figura 19. Perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes chagásicos en diferentes estadios, y parásitos control



MP: Marcador de peso 50 bp Gene Ruler (Fermentas). H: Humano; V: Vector.

Figura 20. Electroferogramas de los perfiles de LSSP-PCR fluorescente en cepas y aislados de *T. cruzi* y tejidos de pacientes chagásicos



5.2.5 Análisis de perfiles de kDNA y relación con hallazgos patológicos. Los perfiles de LSSP-PCR de los parásitos presentes en los tejidos, sangre y parásitos control mostraron una complejidad similar de los perfiles de los tejidos comparados con los de sangre y los de los parásitos utilizados como control (cepas de referencia y aislados). Esto se reflejó en el promedio del número de bandas para cada perfil, que fue similar en los tres grupos (Tabla 13), con mayor cantidad de bandas en los perfiles de los parásitos control. Lo mismo ocurrió con el número de bandas compartidas dentro de cada grupo las cuales fueron similares, con un mayor porcentaje en las muestras de sangre periférica en relación con los otros dos grupos.

Tabla 13. Análisis de los perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de los tejidos, sangre periférica y cepas de *T. cruzi* mediante DNA-POP.

Grupo	Promedio del No. de bandas por carril (+/- SD)	Promedio del No. de bandas compartidas entre pares (+/- SD)	Proporción bandas compartidas
Tejidos	6,1 (+/- 1,3)	2,6 (+/- 1,3)	42%
Sangre periférica	5,4 (+/- 1,3)	2,4 (+/- 0,7)	45%
Cepas	7 (+/- 1,9)	2,6 (+/- 1,6)	37%
Todos los grupos	6,2 (+/- 1,5)	2,4 (+/- 1,2)	39%

SD: Desviación estándar.

Al analizar los tejidos en relación con la severidad del cuadro histopatológico, el número de bandas de los perfiles de kDNA correspondientes a casos leves, fue mayor que el de los casos severos. De igual manera, se evidenció una mayor variabilidad intraespecífica de los parásitos causantes de las formas menos severas, lo cual se vio reflejado en la menor proporción de bandas compartidas con respecto al grupo de mayor severidad (Tabla 14).

El análisis conjunto de los 11 tejidos, 7 muestras de sangre y 7 parásitos control mediante la construcción de dendrogramas genéticos, mostró un agrupamiento de los perfiles con respecto al linaje de *T. cruzi*, observándose una distribución de los linajes *T. cruzi* I y *T. cruzi* II en dos grupos separados con excepción de las muestras B-01 y B-02 que se agruparon en la rama correspondiente a *T. cruzi* II (Figura 21). Las cepas de referencia se relacionaron con los dos linajes principales de *T. cruzi* como era de esperarse (Figura 22).

Tabla 14. Análisis de los perfiles de LSSP-PCR obtenidos a partir de los tejidos con respecto a la severidad del cuadro histopatológico mediante DNA-POP.

Descripción histopatológica	% de tejidos (No. de tejidos/total)	Promedio del No. de bandas por carril (+/- SD)	Promedio del No. de bandas compartidas entre pares (+/- SD)	Proporción bandas compartidas
Cuadros leves de inflamación y fibrosis	54,5% (6/11)	6,7 (+/- 1,4)	2,8 (+/- 1,5)	42%
Cuadros severos de inflamación, necrosis y fibrosis	45,6% (5/11)	5,2 (+/- 1,0)	3,5 (+/- 0,9)	67%
Combinado	100% (11/11)	6,1 (+/- 1,3)	2,6 (+/- 1,3)	42%

SD: Desviación estándar.

Figura 21. Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR en las muestras de tejidos, sangre periférica y cepas de *T. cruzi*.

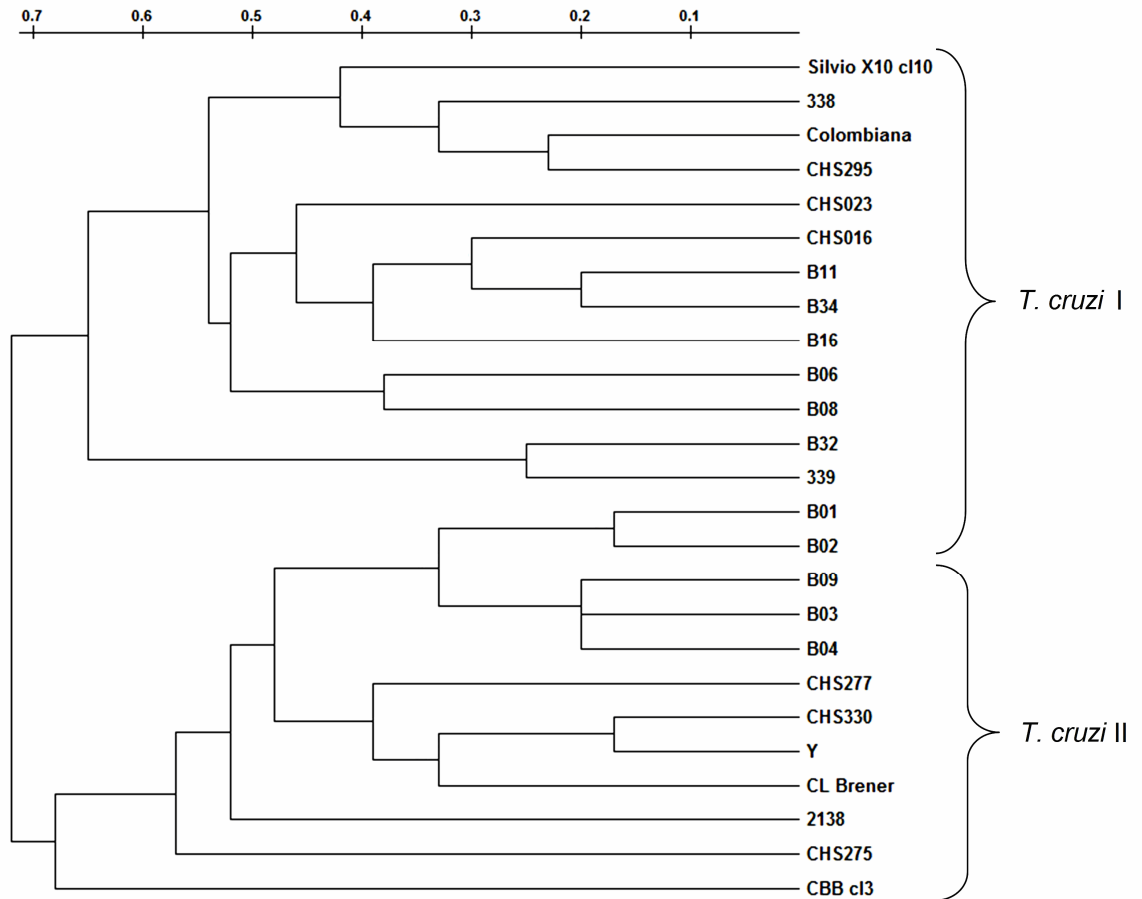
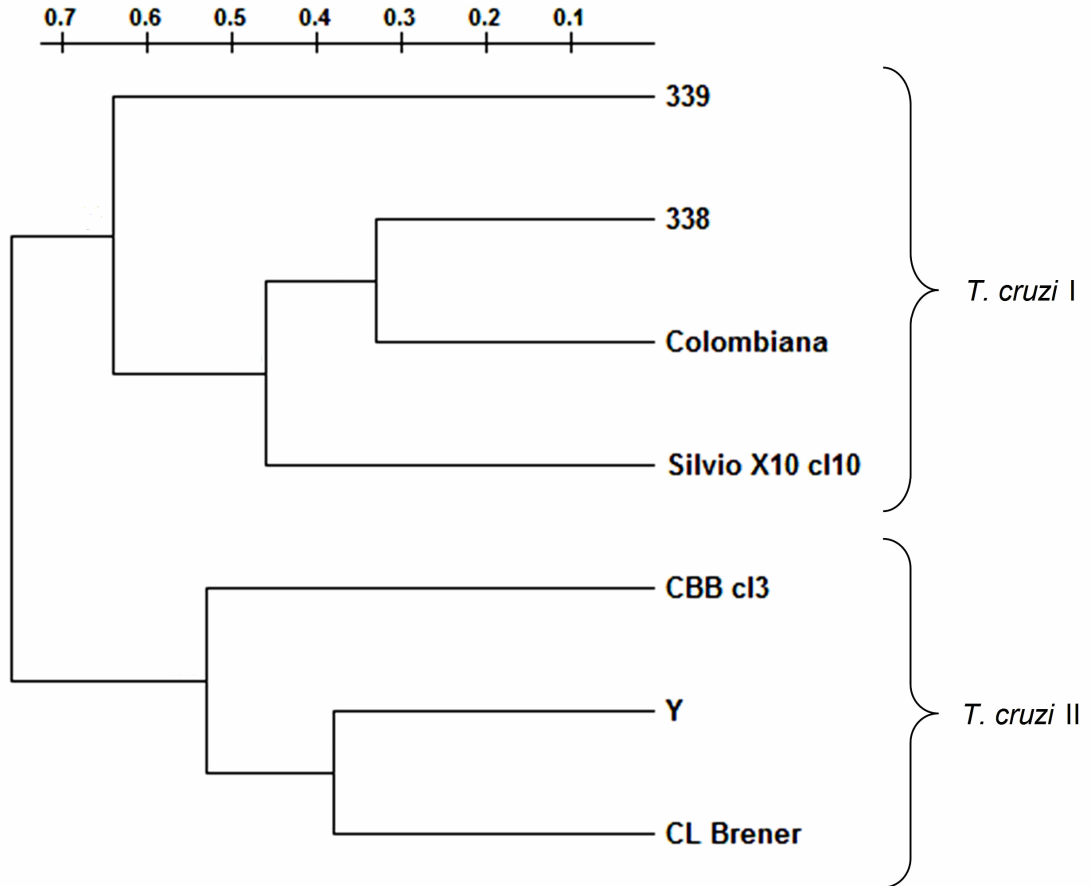
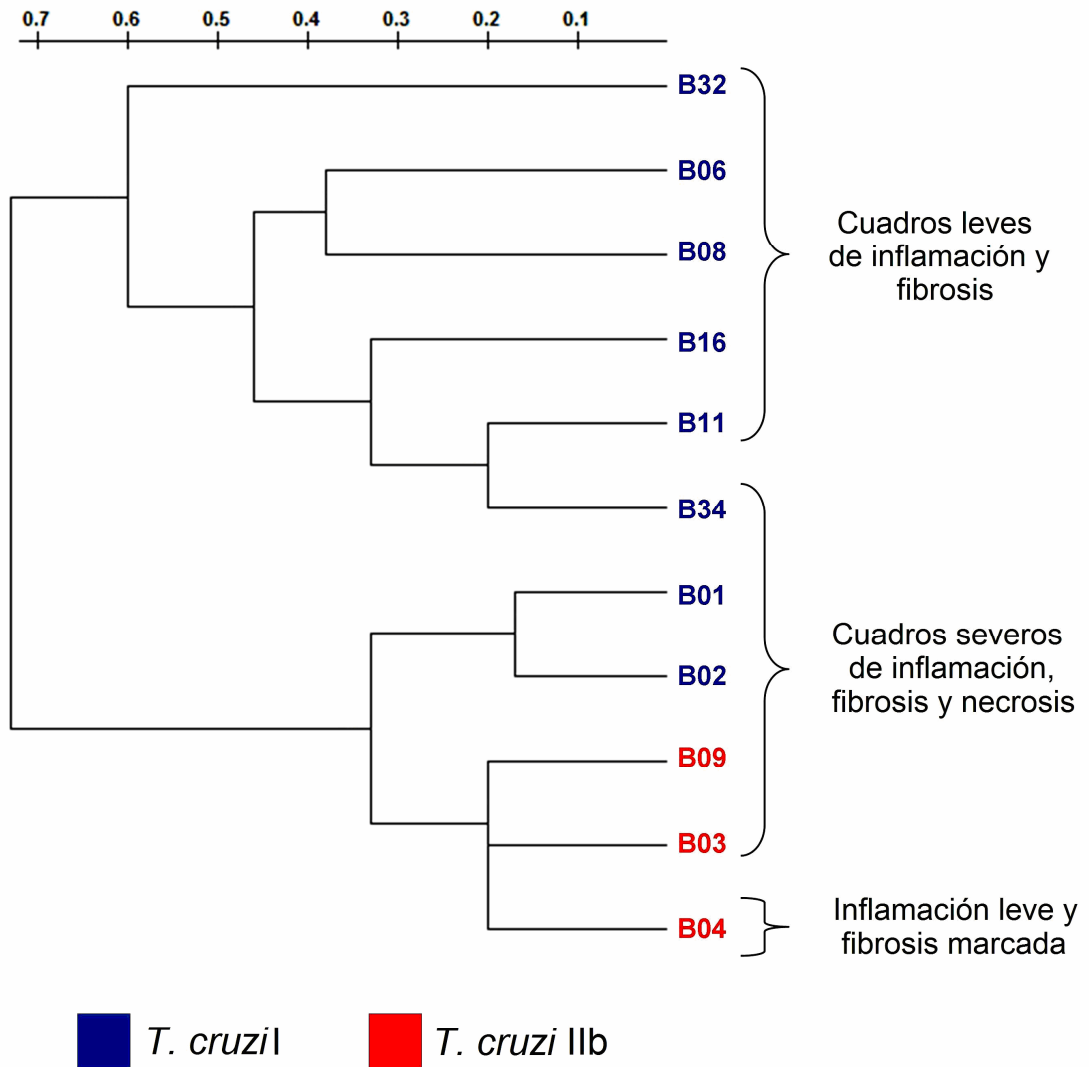


Figura 22. Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR en las cepas de *T. cruzi* utilizadas como control.



El análisis de la distribución de los perfiles de los tejidos en los dendrogramas evidenció una tendencia a la distribución en una sola rama de tejidos con manifestaciones histopatológicas similares, con excepción de las muestras B-04 y B-34 (Figura 23). Sin embargo, no se observó una relación directa entre el linaje de *T. cruzi* presente en el tejido y la severidad del cuadro histopatológico, ya que tanto *T. cruzi* I como *T. cruzi* IIb produjeron cuadros inflamatorios y de daño al tejido con intensidades que variaron desde leves hasta severas (Figura 23).

Figura 23. Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR en las muestras de tejidos con respecto a la severidad del cuadro histopatológico.

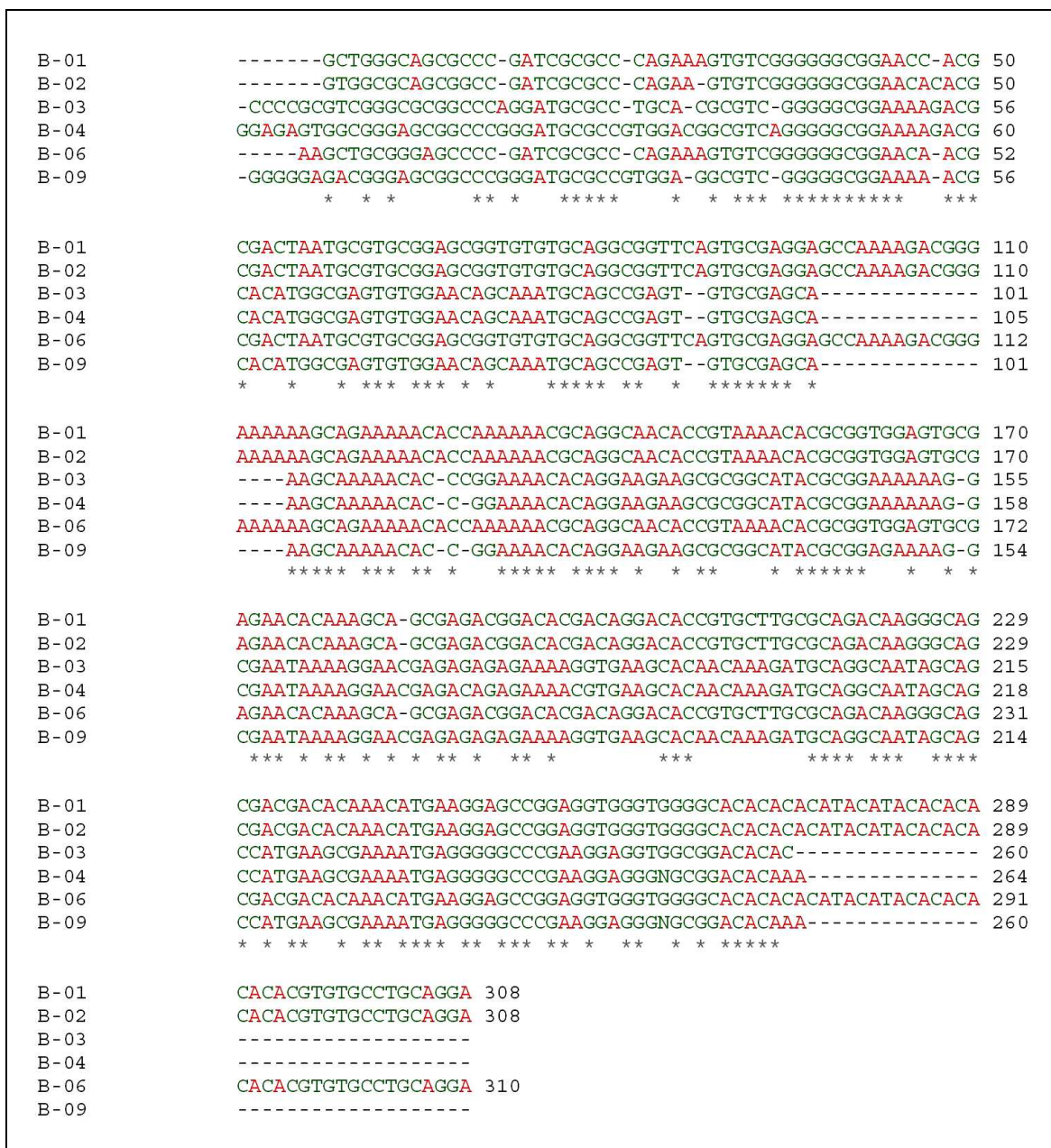


5.2.6 Análisis de secuencias de DNA. La secuenciación de algunos de los fragmentos amplificados del gen mini-exon confirmó los genotipos, identificando en los tejidos tanto *T. cruzi* I como *T. cruzi* IIb. Los alineamientos obtenidos con el programa BLAST mostraron un alto grado de similitud entre las secuencias de los fragmentos amplificados de las muestras B-03, B-04 y B-09 con cepas de *T. cruzi* IIb reportadas en la base de datos de NCBI. Los más altos valores de similitud se obtuvieron con la cepa colombiana AF1 para los *T. cruzi* IIb y con las cepas colombianas Ac17, HA, Ac29 y Gal52 para los *T. cruzi* I. Los valores obtenidos para estas y las otras cepas se muestran en la tabla 14, así como el alineamiento de las secuencias con el programa ClustalW2 en la figura 24.

Tabla 15. Porcentajes de identidad obtenidos en la comparación de secuencias del gen mini-exon de cepas de *T. cruzi* con los encontrados en los tejidos con las bases de datos. En azul se resaltan los números de acceso de las secuencias en la base de datos del NCBI.

Cepa/Tejido	B-01 (<i>T. cruzi</i> I)	B-02 (<i>T. cruzi</i> I)	B-03 (<i>T. cruzi</i> IIb)	B-04 (<i>T. cruzi</i> IIb)	B-06 (<i>T. cruzi</i> I)	B-09 (<i>T. cruzi</i> IIb)
Ac17 (<i>T. cruzi</i> I) AY646663.1	100%	100%	-	-	100%	-
HA (<i>T. cruzi</i> I) AY646656.1	100%	100%	-	-	100%	-
Ac29 (<i>T. cruzi</i> I) AY646677.1	100%	100%	-	-	100%	-
Gal52 (<i>T. cruzi</i> I) AY646668.1	100%	100%	-	-	100%	-
SN8C (<i>T. cruzi</i> I) EU127305.1	98%	98%	-	-	98%	-
JEMC (<i>T. cruzi</i> I) EU127299.1	98%	98%	-	-	99%	-
AF1 (<i>T. cruzi</i> IIb) AY646678.1	-	-	97%	97%	-	97%
Tu18 (<i>T. cruzi</i> IIb) AY367125.1	-	-	95%	96%	-	96%
SC43 (<i>T. cruzi</i> IIb) AY367127.1	-	-	91%	93%	-	91%
MN (<i>T. cruzi</i> IIb) AY367128.1	-	-	89%	91%	-	89%
CL Brener (<i>T. cruzi</i> IIe) U57984.1	-	-	91%	93%	-	91%

Figura 24. Alineamiento múltiple generado a partir de las secuencias del gen mini-exon de *T. cruzi* presentes en los tejidos infectados, realizado con el programa ClustalW2



*: Regiones conservadas entre todas las secuencias.

6. DISCUSION

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad de Chagas aún constituye una de las enfermedades tropicales más importantes en la actualidad en centro y Suramérica. A nivel mundial cerca de 100.000 personas mueren al año víctimas de la enfermedad (WHO, 2002). En Colombia la enfermedad de Chagas tiene un impacto social muy grande en áreas rurales, debilitando personas que usualmente dependen de la fuerza física para su sustento. Hasta el momento no existe un tratamiento que lleve a la cura de las manifestaciones clínicas en la fase crónica, pues la eficiencia de la terapia en esta fase aún no es clara. A pesar de observarse regresión de las lesiones inflamatorias y fibróticas en algunos estudios experimentales, aún son necesarios estudios clínicos para esclarecer y confirmar estos datos (Punukollu *et al.*, 2007).

Desde los estudios de Carlos Chagas en 1909, se han descrito variaciones en los parásitos en el primer caso humano descrito por Chagas en la paciente Berenice (Chagas, 1909), quien presentaba la forma crónica asintomática de la enfermedad y falleció por una causa no relacionada a la enfermedad de Chagas. En 1962 y en 1978 fueron aisladas dos cepas de *T. cruzi* del torrente circulatorio de la paciente, denominadas Be62 y Be78, respectivamente. Posteriormente, quedó demostrado que a pesar de haber sido aisladas de una paciente asintomática estas dos cepas eran capaces de producir la enfermedad en los modelos murino y canino y presentaban comportamientos diversos con distinta patogenicidad en los dos modelos animales (Araújo *et al.*, 2002). No es posible descartar la posibilidad de que la paciente Berenice hubiese sido infectada más de una vez durante su vida, pero suponiendo que ella fue infectada solo una vez, queda claro que las subpoblaciones presentes en el torrente circulatorio de un paciente podrían fluctuar de acuerdo con el tiempo.

La posibilidad de que distintas subpoblaciones puedan ser encontradas en momentos diferentes en el torrente circulatorio y en diferentes tejidos de un mismo individuo, constituye el centro del modelo histotrópico-clonal propuesto para la enfermedad de Chagas (Macedo & Pena, 1998 y 2002). De acuerdo con lo postulado en este modelo, para una correcta inferencia de correlaciones entre las cepas aisladas de humanos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, es de fundamental importancia la caracterización del parásito directamente en el tejido infectado. Debido a la baja concentración de parásitos observada en las fases crónicas de la enfermedad, se creó la necesidad de que las metodologías de identificación y caracterización del parásito fueran lo suficientemente sensibles y específicas.

En el estudio de la enfermedad de Chagas, la mayor parte de los trabajos realizados han utilizado parásitos obtenidos de sangre periférica, probablemente con poblaciones mixtas las cuales han sido sometidas a cultivos *in vitro*, pases en animales de laboratorio o xenodiagnóstico, métodos que favorecen ampliamente la selección clonal, conllevando a la probabilidad de que las poblaciones del parásito obtenidas en el cultivo puedan ser diferentes de aquellas presentes en la sangre del hospedero (Macedo & Pena, 2004). Adicionalmente, debido al polimorfismo biológico, diferentes clones de una cepa podrían tener tropismo por diferentes tejidos, por lo tanto los parásitos circulantes en sangre y disponibles para el hemocultivo o el xenodiagnóstico pueden ser diferentes de los que están en los tejidos, representando un factor importante para determinar el curso clínico de la enfermedad. Estudios en modelos animales han mostrado diferencias entre el linaje de *T. cruzi*, el tropismo por el tejido y el daño producido (de-Diego et al., 1998; Andrade et al., 1999; Vago et al., 2000; de-Lana et al., 2000; Andrade et al., 2002; Marinho et al., 2004). En países como Colombia, México, Panamá, Ecuador, Perú y algunos de América Central el linaje *T. cruzi* I ha sido el único asociado con la enfermedad de Chagas (Higo et al., 1997 & 2004; Montilla et al., 2002). En nuestro país este linaje representa la mayoría de los aislados obtenidos a partir de

vectores y pacientes (alrededor del 80%), con aislamientos ocasionales de parásitos Z3 (correspondientes al linaje *T. cruzi* IIa) (Rodríguez *et al.*, 1998; Cuervo *et al.*, 2002), los cuales no se han encontrado asociados al desarrollo de la patología. El linaje *T. cruzi* II ha sido identificado ocasionalmente en vectores y diferentes reservorios silvestres en Colombia (Cuervo *et al.*, 2002; Montilla *et al.*, 2002). Recientemente se reportó la presencia del linaje *T. cruzi* II en un reservorio doméstico (Triana *et al.*, 2006) y del linaje IIb en un vector (Salazar *et al.*, 2007), apoyando la posibilidad de que linajes distintos a *T. cruzi* I estén asociados al ciclo doméstico de transmisión. No existen reportes de aislamiento de cepas diferentes a *T. cruzi* I o zimodema 3 a partir de pacientes chagásicos en ninguna de sus fases en la región norte de Suramérica y Centroamérica. Por el contrario en países de la zona sur de nuestro continente como Brasil, Argentina y Chile, *T. cruzi* II es el linaje más aislado de pacientes chagásicos y el que más se asocia al desarrollo de las formas cardíacas crónicas de la patología, causando formas digestivas severas como megaesófago y megacolon además de cuadros mixtos (cardiodigestivos). Por ello, en esta región del continente el ciclo de transmisión doméstico de la enfermedad se ha restringido casi exclusivamente a parásitos del linaje II, mientras que el linaje I se ha asociado más al ciclo selvático, llegando incluso a pensar en la inocuidad de este linaje para causar la enfermedad (Di Noia *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2003; Buscaglia & Di Noia 2003; Freitas *et al.*, 2005).

En este trabajo, mediante la combinación de varias metodologías moleculares y ante la carencia de información relacionada con el linaje de *T. cruzi* presente en los diferentes tejidos de pacientes chagásicos, no solo en Colombia sino en países de Centroamérica y norte de Suramérica, se analizó y detectó la presencia de *T. cruzi* en tejidos en un porcentaje de 24,4% de los pacientes provenientes de Santander con alteraciones histopatológicas compatibles con la enfermedad. Además se demostró el predominio del linaje *T. cruzi* I como era de esperarse para esta región del continente y por primera vez se describió la presencia en un porcentaje elevado (25%) del linaje *T. cruzi* IIb asociado con la patología (Zafra *et*

al., 2007b. Anexo B). Este es un hallazgo de gran importancia a nivel epidemiológico, debido a que hasta el momento en Colombia se desconocían casos de la enfermedad producidos por el linaje *T. cruzi* II. El linaje *T. cruzi* IIb encontrado en los tejidos corresponde al *T. cruzi* II clásico asociado al zimodema Z2 (Miles *et al.*, 1978) y es uno de los tres linajes ancestrales propuestos para el escenario evolutivo de *T. cruzi*, agrupándose en la rama mitocondrial C (Freitas *et al.*, 2006), siendo el linaje más asociado al desarrollo de cuadros crónicos severos de la enfermedad en Brasil (Macedo & Pena, 2004; Freitas *et al.*, 2005). La secuenciación de los fragmentos amplificados del gen mini-exon confirmaron que las secuencias detectadas en las muestras B-03, B-04 y B-09 corresponden al linaje *T. cruzi* IIb, ya que se obtuvieron porcentajes de identidad cercanos al 100% cuando se alinearon y compararon con secuencias de aislados y cepas de estos linajes. Es muy importante encontrar que en los alineamientos realizados con el software BLAST, las 3 secuencias de *T. cruzi* IIb detectadas en tejido cardíaco presentaron el porcentaje de identidad más alto con el aislado colombiano AF1 (97%), superior con respecto a cepas de *T. cruzi* IIb de otras regiones del continente. Este resultado muestra la presencia de este linaje en el ciclo de transmisión doméstico y explica cómo finalmente se encuentra infectando los tejidos y produciendo la enfermedad. Teniendo en cuenta que éste es el único aislado del linaje *T. cruzi* IIb reportado en Colombia, se podría sugerir una conservación muy elevada de estas secuencias en clones de *T. cruzi* IIb de Colombia, por lo menos en lo que respecta al espaciador intergénico del mini-exon. Esto ya se ha considerado anteriormente para aislados colombianos de *T. cruzi* I, al encontrar similitudes en los perfiles de kDNA entre aislados provenientes de distintas regiones de Colombia, sugiriendo una posible asociación de los perfiles específicos de cada cepa con su origen geográfico (Salazar *et al.*, 2007).

La presencia de *T. cruzi* IIb en tejidos de pacientes encontrada en este trabajo no solo demuestra su implicación en la patología sino su importancia epidemiológica, dado que estaría participando activamente en el ciclo doméstico de transmisión y

por consiguiente podría estar implicado en que las manifestaciones clínicas observadas hasta el momento en Colombia y demás países vecinos presenten una mayor variabilidad que la reportada. Aunque *T. cruzi* I sigue siendo más frecuente en nuestro país, la presencia de *T. cruzi* II en tejidos de pacientes chagásicos lleva a replantear el papel y la epidemiología de este linaje no solo en Colombia, sino en países cercanos geográficamente. En Venezuela se ha reportado una circulación predominante del linaje *T. cruzi* I en pacientes en la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Añez *et al.*, 2004). Aunque en este trabajo el 74% de los aislados fueron genotipificados como *T. cruzi* I, se encontró una frecuencia elevada del linaje *T. cruzi* II en sangre periférica (26%), probablemente pertenecientes al linaje *T. cruzi* IIa (Zimodema Z3). Esto se correlaciona con lo observado en Santander, donde el zimodema Z3 se identificó en 20% de los aislados de pacientes (Angulo, 2000), presentándose además una cercanía geográfica con la región occidental de Venezuela en donde se realizó el trabajo de Añez *et al.* (2004). En otros trabajos de nuestro grupo, recientemente se ha identificado el linaje *T. cruzi* IIb directamente en sangre periférica de pacientes con cardiopatía chagásica provenientes del departamento de Santander (Zafra *et al.*, 2007c; Manuscrito sometido a publicación), un hallazgo que unido a lo encontrado en tejidos, es evidencia directa de que los dos linajes principales de *T. cruzi* circulan en nuestra región y en el país no solo entre los vectores y reservorios, sino también en los pacientes, infectando y produciendo cuadros severos de la enfermedad de Chagas en Colombia con las consecuencias clínicas y epidemiológicas derivadas de ello.

El hecho de que en Colombia solo se aislen cepas de *T. cruzi* I a partir de pacientes y el haber demostrado la presencia de *T. cruzi* II en tejidos, hace pensar en una posible selección de este linaje en el cultivo, probablemente por una menor capacidad de adaptación al medio de *T. cruzi* IIb o por un tropismo que lo haga pasar rápidamente de la sangre al tejido. Esta podría ser una razón por la cual el linaje IIb solo se ha podido detectar por PCR en sangre de pacientes colombianos

(Zafra *et al.*, 2007c; Manuscrito sometido a publicación) y solo se haya aislado a partir de vectores (Triana *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2007). En estudios con mezclas de parásitos de diferentes linajes generalmente uno de ellos predomina en sangre periférica (Deane *et al.*, 1984). Esto se observó en ratones infectados con una mezcla de cepas correspondientes a los linajes I y II, en donde *T. cruzi* I prevaleció sobre *T. cruzi* II en sangre periférica (Andrade *et al.*, 1999). Este comportamiento también se observó al infectar ratones con clones colombianos de *T. cruzi* de los linajes I y II (Botero *et al.*, 2007). Además se ha observado que en cultivo, los parásitos pertenecientes al linaje II crecen más lento que los del linaje I (Diosque *et al.*, 2003). El hecho de no encontrar otros subgrupos del linaje *T. cruzi* II en los tejidos ni en las muestras de sangre analizadas, sugiere una circulación predominante del sublinaje IIb y zimodema 3 como causantes de la enfermedad sobre los otros sublinajes de *T. cruzi* II en nuestra región. Con relación a esto, la única cepa aislada en Colombia perteneciente al linaje *T. cruzi* IIb (aislado AF1) fue obtenida del vector *Panstrongylus geniculatus*, en el departamento de Antioquia (Salazar *et al.*, 2007), al igual que otros 2 aislados (cepas IPAN/CO/94/Cepa 1 e IPAN/CO/94/Cepa 6) clasificados solo como *T. cruzi* II (Montilla *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta que este vector circula en una proporción relativamente alta en algunos municipios de Santander (Angulo, 2000) y dada la cercanía geográfica con el departamento de Antioquia, es muy probable la existencia de un papel relevante de este vector en la transmisión de parásitos del linaje *T. cruzi* II en nuestro país y en nuestra región.

Por otra parte, este estudio describe por primera vez en Colombia la presencia de *T. cruzi* en esófago y más aún, la presencia de una infección mixta en un paciente, con los linajes *T. cruzi* IIb en corazón y *T. cruzi* I en esófago (Anexo C; Manuscrito en preparación). El paciente presentaba una insuficiencia cardiaca congestiva con cardiomegalia, sin alteraciones ni dilataciones en el tubo digestivo. Mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados del gen mini-exon se confirmó también que las secuencias detectadas en las muestras de corazón (muestra B-

04) y esófago (muestra B-06) corresponden a los linajes *T. cruzi* IIb y *T. cruzi* I respectivamente, obteniéndose porcentajes de identidad cercanos al 100% cuando se compararon con secuencias de cepas y aislados de estos linajes. También se encontró una gran homología entre la secuencia detectada en esófago con varios aislados colombianos de *T. cruzi* pertenecientes al linaje I (aislados Ac17, HA, Ac29 y Gal52). Nuestros resultados no mostraron un tropismo del linaje *T. cruzi* II hacia el esófago, aún cuando en el mismo paciente se detectó este linaje en tejido cardíaco. Aunque en el examen macroscópico del esófago no se observaron alteraciones, y en la capa muscular estriada del esófago infectado no se observaron signos de inflamación severa ni destrucción del tejido no se puede descartar una invasión reciente de los parásitos al esófago de este paciente, lo que explicaría la ausencia de nidos de amastigotes y de inflamación marcada. Otra posible explicación es un menor potencial patogénico de *T. cruzi* I en el esófago, unido a un eficiente control de la infección por el sistema inmune del hospedero (Crema, 2006). Además debe tenerse en cuenta el carácter mixto de la infección, con dos linajes distintos en este paciente. En modelos murinos se han descrito diferencias significativas en la severidad de las infecciones experimentales con un solo clon de *T. cruzi* comparadas con las infecciones mixtas, como resultado de una posible interacción entre los diferentes clones, observándose cambios en sus propiedades biológicas lo cual podría inhibir o estimular el potencial patogénico de cada uno de ellos (Martins *et al.*, 2006). Aunque en otros órganos de este paciente no se detectaron parásitos por PCR ni por histología, no se puede descartar la presencia de *T. cruzi* en órganos como el colon, ya que la amplificación por PCR en este tejido se dificulta dada la gran cantidad de inhibidores para la PCR presentes en él, además de la posible existencia de infecciones con un número muy bajo de parásitos. Según lo descrito en países del cono sur del continente, *T. cruzi* II parece estar mucho más asociado al desarrollo de fases crónicas digestivas y mixtas que *T. cruzi* I (Miles *et al.*, 1981; Zingales *et al.*, 1998; Kawashita *et al.*, 2001; Miles, 2003) por lo cual se ha pensado que, dada la supuesta ausencia del linaje II, en nuestro país no se

presentarían las formas digestivas severas como megaesófago o megacolon. Este comportamiento también se ha visto en Bolivia, en donde el desarrollo de megacolon parece estar restringido al linaje *T. cruzi* II, aunque el sublinaje específico no se ha esclarecido aún (Virreira *et al.*, 2006). Por consiguiente, este resultado lleva a replantear el concepto de si en Colombia y otros países del norte del continente, la única forma de presentación de la enfermedad de Chagas es la cardiaca, o si hay presencia en un menor porcentaje de alteraciones digestivas como megaesófago o megacolon que no se han reportado, debido a la necesidad de una mayor tecnología diagnóstica, difícil de realizar en las áreas rurales donde se ubican las regiones endémicas (Castro *et al.*, 1999). Este hallazgo además está de acuerdo con algunos reportes de pacientes con megaesófago y alteraciones digestivas en México (Ocampo-González *et al.*, 1993; Lozano-Kasten *et al.*, 1993; Sánchez-Guillén *et al.*, 2006), así como con el 6% de alteraciones digestivas asociadas a la enfermedad de Chagas reportadas en Venezuela, principalmente megasíndromes (WHO, 1999). Aunque en el transcurso de 4 décadas solo se han reportado alrededor de 30 casos digestivos en ese país, estos datos unidos a nuestro reciente hallazgo en tejidos y el desconocimiento general de la prevalencia de alteraciones de este tipo en Colombia alertan sobre la posible presencia de formas digestivas de la enfermedad no tenidas en cuenta y, más allá de esto, la posibilidad de encontrar cuadros crónicos mixtos (formas cardiodigestivas).

Recientemente se han utilizado diversas metodologías moleculares basadas en PCR para identificar directamente en los tejidos afectados, no solo el linaje del parásito, sino para evidenciar las diferencias entre clones del mismo. Una de ellas, la LSSP-PCR, fue inicialmente aplicada con éxito en el análisis de secuencias mitocondriales humanas, mostrando en todos los casos una excelente estabilidad y reproducibilidad de los perfiles de bandas generados para cada muestra, con la ventaja de ser una técnica simple que permite un análisis visual directo que puede acoplarse al análisis bioinformático (Barreto *et al.*, 1996). En el estudio de microorganismos la técnica se ha utilizado en la determinación de la variabilidad

genética de varias especies de *Leptospira* (Oliveira *et al.*, 2003), virus de la hepatitis C (Stamenkovic *et al.*, 2001), *Entamoeba histolytica* (Gomes, 1997) y particularmente de parásitos de la familia Kinetoplastidae, como *T. rangeli* (Cuervo *et al.*, 2006; Marquez *et al.*, 2007) y *Leishmania* (Ferreira *et al.*, 2007). En *T. cruzi*, Los hallazgos relacionados con la variabilidad genética del kinetoplasto, sugieren que el grado de similitud mostrado por los perfiles de LSSP-PCR de dos parásitos reflejan, al menos en parte, la distancia genética entre ellos (Vago *et al.*, 1996). De igual forma que con el DNA mitocondrial humano, esta metodología se ha aplicado al estudio de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en tejidos de ratones infectados experimentalmente, observándose una distribución diferencial de varios clones hacia distintos tejidos del mismo ratón (Andrade *et al.*, 1999). En humanos también se demostró una asociación entre tropismo tisular y presencia de clones específicos del parásito (Vago *et al.*, 1996), observándose en un caso de compromiso cardiodigestivo diferencias genotípicas a nivel de las poblaciones presentes en los dos órganos afectados, como una demostración clara del tropismo diferencial y su asociación con la forma de presentación de la patología (Vago *et al.*, 2000).

A través del análisis vertical de las bandas por el software DNA-POP observamos un alto grado de polimorfismo genético en los perfiles de kDNA de *T. cruzi*, obteniéndose porcentajes de bandas compartidas de 42% para los tejidos, 45% para las muestras de sangre periférica y 37% para el grupo de parásitos control. Sin embargo, no se observaron diferencias marcadas entre los perfiles de estos tres grupos ya que solo se dió un ligero aumento del promedio de bandas obtenidas para los parásitos control con una menor proporción de bandas compartidas, indicando una mayor heterogeneidad genética con respecto a los otros dos grupos. Esto concuerda con lo descrito por Diosque *et al.* en Argentina (2003), al comparar aislados obtenidos de reservorios y vectores con los obtenidos de pacientes, observándose una menor diversidad genética en los aislados de humanos. Es importante tener en cuenta que el análisis por microsatélites reveló

que las poblaciones presentes en los tejidos fueron predominantemente monoclonales, presentando por consiguiente menor variabilidad intraespecífica que las poblaciones policlonales y sin la posibilidad de obtener perfiles de kDNA combinados, pertenecientes a varios clones. Al analizar por separado los perfiles correspondientes a los tejidos y agruparlos de acuerdo a la severidad del daño tisular producido en formas leves y severas, se observó un pequeño aumento en complejidad de los perfiles de kDNA presentes en las formas leves de la patología reflejadas en cuanto a diferencias en el número y proporción de bandas compartidas, con respecto al grupo de mayor severidad. Esto podría sugerir que un aumento en la complejidad de los perfiles de LSSP-PCR podría estar relacionado con una disminución en la severidad del daño hacia el tejido, sin embargo, esto deberá confirmarse con un número superior de muestras.

La distribución observada en los dendrogramas, de los perfiles de kDNA en un grupo correspondiente al linaje *T. cruzi* I fue claro, mientras que las muestras tipificadas como *T. cruzi* II se organizaron de forma separada, con excepción de dos muestras de tejidos infectados con *T. cruzi* I (muestras B-01 y B-02) que se ubicaron en la rama correspondiente a *T. cruzi* II. Eventualmente, al descartar la presencia de una mezcla de poblaciones del parásito o de un linaje híbrido (*T. cruzi* IId o IIe) en estas muestras por medio de todos los marcadores de clasificación utilizados y la secuenciación de los productos de PCR, se podría sugerir que algunas poblaciones de *T. cruzi* distantes filogenéticamente, pueden poseer un conjunto de minicírculos capaces de generar perfiles similares en la LSSP-PCR. Al relacionar la distribución de los perfiles de los tejidos con lo encontrado histopatológicamente, se observó una tendencia a la distribución en una misma rama de tejidos que presentaban las mismas manifestaciones histopatológicas (leves o severas), aunque sin formar un agrupamiento claro. No se encontró ninguna relación directa de estas manifestaciones con el linaje de *T. cruzi* presente en el tejido, ya que tanto parásitos de los linajes *T. cruzi* I como *T. cruzi* II produjeron cuadros inflamatorios y destructivos de intensidades leves y

severas. Este hallazgo concuerda con lo descrito anteriormente en Brasil, donde el análisis de los perfiles de kDNA de parásitos aislados a partir de 132 pacientes chagásicos con distintas formas clínicas de la enfermedad, mostró un alto grado de variabilidad genética en los perfiles de kDNA entre todas las formas clínicas y también dentro de cada una de ellas, sin encontrarse relación alguna con la forma o intensidad del proceso patológico (Lages-Silva *et al.*, 2006). Una gran limitante de este estudio es que se realizó sobre las cepas aisladas de cada uno de los pacientes, dándose oportunidad para la selección de las mismas en cultivo. Aunque en nuestro análisis utilizamos muestras de tejidos y DNA aislado de sangre de pacientes chagásicos como patrón de comparación, justamente para evitar la selección que se podría dar al aislar el parásito por los métodos convencionales, obtuvimos el mismo resultado. En otro estudio realizado en nuestro país, el análisis por LSSP-PCR en ratones infectados *in vitro* con dos cepas colombianas de *T. cruzi* I tampoco mostró una distribución diferencial de estas cepas hacía un tejido en especial, o a la producción de una manifestación específica (cardiaca o digestiva), pero sí se evidenciaron diferencias entre las poblaciones presentes en sangre y en los diferentes órganos a través del tiempo (Mejía *et al.*, 2005). De esta manera, nuestros resultados no mostraron un tropismo diferencial de los diferentes linajes de *T. cruzi* encontrados hacia tejidos.

No se obtuvieron diferencias suficientes para establecer subgrupos dentro de los respectivos linajes mediante los perfiles de kDNA, aunque se observó en general una mayor variabilidad en los perfiles del linaje *T. cruzi* I comparados con los del linaje *T. cruzi* II. Tampoco se estableció una relación de los perfiles obtenidos de sangre periférica de pacientes chagásicos, con la fase clínica a la que pertenecen. Basados en estos resultados se podría postular que no hay relación entre el linaje de *T. cruzi* y la forma de presentación de la enfermedad en nuestro país.

Es evidente que no se debe considerar a las cepas del linaje I como no causantes de fases crónicas sintomáticas de la enfermedad de Chagas, como se ha sugerido

anteriormente en países del sur del continente (Di Noia *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2003; Buscaglia & Di Noia 2003; Freitas *et al.*, 2005) ya que diversos estudios han demostrado lo contrario para los países del norte de Suramérica (Añez *et al.*, 2004; Sánchez-Guillen *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2006), pero lo que debe estar bien establecido es el papel de cada uno de los linajes de *T. cruzi* en la patogénesis y el desarrollo de las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Aunque en este trabajo no observamos una distribución diferencial en cuanto al linaje de *T. cruzi* y la severidad del cuadro histopatológico, debe tenerse en cuenta el papel del genoma humano en el desarrollo de la enfermedad. Así como la variabilidad genética de *T. cruzi* puede determinar el curso de la infección, es también importante tener en cuenta el efecto de la variabilidad genética del hospedero, no solo en la susceptibilidad a desarrollar o no la infección sino porque esto también podría influir en la distribución de un determinado linaje del parásito (*T. cruzi* I o II) hacia los tejidos o su permanencia en sangre. Esto se ha observado en modelos murinos, en donde se demostró claramente una diferencia en la distribución diferencial de dos clones de *T. cruzi* de diferente linaje hacia los distintos tejidos de ratones con diferencias en el haplotipo H-2 (Andrade *et al.*, 2002). En población santandereana, nuestro grupo ha encontrado polimorfismos genéticos en los genes de las citoquinas IL-1 β (Florez *et al.*, 2005) e IL-12 β (Zafra *et al.*, 2007a), y en los genes de los receptores de citoquinas CCR5 e IL-4R α asociados al desarrollo de la cardiopatía chagásica (manuscritos en preparación), que podrían estar influyendo sobre la susceptibilidad a desarrollar las formas crónicas más severas de la enfermedad, dependiente o independientemente del genotipo del parásito. Teniendo en cuenta esto, una aproximación interesante en el estudio de la inmunopatogénesis de la enfermedad sería el estudio simultáneo de la variación del genoma humano y del parásito, para así correlacionar cómo las variaciones en distintos genes de respuesta inmune del hospedero influyen en la infección con determinado genotipo de *T. cruzi*, especialmente cuando se presentan infecciones mixtas ya que la respuesta

inmunológica producida frente a un clon podría influir en la eliminación o el desarrollo de los otros (Martins *et al.*, 2006).

En conclusión, los resultados de este trabajo demostraron la presencia del linaje *T. cruzi* IIb en tejidos asociado con formas severas de la patología así como la infección por *T. cruzi* I en órganos distintos al corazón, aunque no se observó una relación directa entre los linajes y la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* con las formas clínicas de la patología en pacientes del departamento de Santander. Se necesitan estudios adicionales en vectores, reservorios y pacientes para establecer la frecuencia del linaje *T. cruzi* IIb, así como su papel exacto en la patogénesis de la enfermedad de Chagas y en el ciclo de transmisión doméstico en Colombia y otros países de la región norte de Suramérica y América central. Adicionalmente, es fundamental esclarecer por qué en estos países el linaje *T. cruzi* II causa menos casos de la enfermedad de Chagas que *T. cruzi* I, en contraste con lo descrito en algunos países como Brasil, Chile y Argentina.

7. CONCLUSIONES

El linaje *T. cruzi* IIb está presente en tejidos de pacientes colombianos con cardiopatía chagásica. Este es el primer reporte de este hallazgo en la región norte de Suramérica y Centroamérica, demostrando la participación activa de *T. cruzi* II en el ciclo de transmisión doméstico en Colombia.

Existen infecciones mixtas de *T. cruzi* I y *T. cruzi* IIb en tejidos de pacientes con cardiopatía chagásica provenientes del departamento de Santander.

Se evidenció la presencia de *T. cruzi* en esófago, y aunque no produjo un cuadro destructivo severo, podría ser indicativo de la presencia de alteraciones digestivas no detectadas o no estudiadas en nuestro país.

Existe un predominio del linaje *T. cruzi* I sobre los demás linajes de *T. cruzi* en pacientes colombianos, en concordancia con lo descrito anteriormente.

No se evidenció un tropismo tisular diferencial de los linajes de *T. cruzi*, ya que tanto *T. cruzi* I como *T. cruzi* II se encontraron infectando tejido cardíaco e histopatológicamente causaron indistintamente las formas leves y severas de la enfermedad.

No se observó una relación entre los perfiles de kDNA obtenidos por LSSP-PCR, con el tipo o severidad de la patología.

8. RECOMENDACIONES

Se requieren más estudios de caracterización genética en Colombia, países de Centroamérica y norte de Suramérica para establecer la frecuencia real del linaje *T. cruzi* II asociado a la patología de la enfermedad de Chagas, así como para esclarecer su papel en el ciclo de transmisión doméstico de la enfermedad.

Se recomienda ampliar el estudio en tejidos de pacientes para confirmar la presencia de *T. cruzi* IIb en otros tejidos y conocer si otros sublinajes de *T. cruzi* II están infectando y produciendo las formas crónicas de la enfermedad en esta región del continente. También, para esclarecer la posible presencia de alteraciones digestivas y/o mixtas en nuestra región.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSSON, Jhon *et al.* Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. En: Immun. Letters. Vol. 86 (2003); p. 207 - 212.

ANDRADE, Luciana O. *et al.* Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 100 (1999); p. 163 - 172.

_____. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. En: Exp. Parasitol. Vol. 100, No 4 (2002); p. 269 - 275.

ANDRADE, Sonia G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. En: Rev. Patol. Trop. Vol. 3 (1974); p. 65 -121.

_____. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. En: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol 76, No. 1 (1982); p. 123.

ANGULO, Víctor Manuel *et al.* Nuevos registros de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) para el departamento de Santander y Colombia. En: XXXIII Congreso nacional de ciencias Biológicas (1998: Ibagué). Programa y resúmenes del XXXIII congreso nacional de ciencias biológicas. Ibagué: Universidad del Tolima, 1998 p. 50.

_____. Programa nacional de prevención y control de la enfermedad de Chagas y la cardiopatía infantil. En: Memorias curso taller internacional control y manejo de la tripanosomiasis americana. Bucaramanga: CINTROP - UIS, 1999. p. 99-108.

ANGULO, Victor Manuel. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. En: M.V.Z. Cordoba Vol. 5, No. 1 (2000); p. 64 - 68.

ANÓNIMO. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a comentary on characterization and nomenclature. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 94 (1999); p. 181 -184.

AÑEZ, Nestor *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. En: Trop. Med. Int. Health. Vol. 9, No. 12(2004); p. 1319 - 1326.

ARAÚJO, Francisco *et al.* Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. En: Acta Tropica Vol. 81, No. 1 (2002); p. 21 - 31.

ASLUND, Lena *et al.* A gene family encoding heterogenous histone H1 protein in *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol Vol. 65 (1994); p. 317 - 330.

AVILA, Herbert *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. En: J. Clin. Microbiol. Vol 31 (1993); p. 2421 - 2426.

BARNABÉ, Christian *et al.* Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. En: Parasitology Vol. 120, No. 5 (2000); p. 513 - 526.

BARRETO, Guillermo *et al.* Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. En: Am. J. Hum. Genet. Vol. 58 (1996); p. 609 - 616.

BARRETT, Michael *et al.* The trypanosomiases. En: Lancet Vol. 362, (2003); p. 1469 - 1480.

BEHREND, Markus *et al.* Control of Chagas disease in blood banks in Colombia .
En: Biomedica Vol. 22 (2002); p. 39 - 45.

BOGLIOLO, Anna Rosa *et al.* Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. En: Acta Tropica Vol. 61 (1996); p. 31 - 40.

BORST, Piet *et al.* On the DNA content and ploidy of trypanosomes. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 6, No. 1 (1982); p. 13 - 23.

BOSSENO, Marie-France, *et al.* Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 95 (2000); p. 601 - 607.

BOTERO, Luz Adriana; MEJÍA, Ana María; TRIANA, Omar. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. En: Biomédica. Suplemento 1. Vol. 27, (2007); p. 64 - 74.

BRENER, Zigman. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. En: Ann. Trop. Med. Parasitol. Vol. 59 (1965); p. 19 - 26.

_____ *et al.* Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. En: Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo Vol. 18, No. 6 (1976); p. 450 - 455.

BRIONES, Marcelo *et al.* 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. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 104 (1999); p. 219 - 232.

BRISSE, Sylvain *et al.* Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 111, No. 1 (2000); p. 95 - 105.

_____ Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. En: Int. J. Parasitol. Vol. 31 (2001); p. 1218-1226.

_____ Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. En: Infect. Genet. Evol. Vol. 2 (2003); p. 173 - 183.

BUILES, Juan José *et al.* Characterization of Colombian Sylvatic *Trypanosoma cruzi* based on RAPD, and dimorphisms of both rRNA and mini-exon gene sequences. En: Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. Suplemento 2. Vol 93 (1998); p. 2.

BUSCAGLIA, Carlos y DI NOIA, Javier. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. En: Microbes Infect. Vol. 5 (2003); p. 419 - 427.

CALZADA, J.E. *et al.* Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. En: Tissue Antigens Vol. 58 (2001); p. 154 - 158.

_____ Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama . En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 74 (2006); p. 762 - 765.

CANO, María *et al.* Molecular karyotype of CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 71 (1995); p. 273 - 278.

CARNEIRO, Mariangela *et al.* Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and Schizodemes. En: Mem. Inst. Osw. Cruz Vol.86 (1991); p. 387 - 393.

CARRASCO, Hernán *et al.* Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 54, No. 4 (1996); p. 418 - 424.

CASTRO, Ana María *et al.* Genetic polymorphism among six *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from chronic chagasic patients. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 94, No 5 (1999); p. 655 - 658.

CENTURION-LARA, Arturo *et al.* Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. En: J. Infect. Dis. Vol. 170 (1994); p. 1334 - 1339.

CHAGAS, Carlos. Nova Tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 1 (1909); p. 159 - 218.

CHIARI, Egler. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 94, suplemento 1 (1999); p. 299-300.

CLARK, Clifford & PUNG, Oscar. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America . En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 66, No 1 (1994) p. 175 - 179.

CORREDOR, Augusto. Situación epidemiológica de la Tripanosomiasis americana en Colombia. En: Memorias curso taller nacional de la enfermedad de Chagas. Universidad Industrial de Santander. Bogotá: Ministerio de salud, 1993;43-45.

COURA, José, *et al.* Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. En: Trends. Parasitol. Vol. 18, No. 4 (2002); p. 171 - 176.

CREMA, Eduardo *et al.* Evaluation of cytokines (MIG, IFN- γ , TNF-A, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. En: Clin. Immunol. Vol. 119 (2006); p. 213 – 218.

CUERVO, Patrícia *et al.* Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 97 (2002); p. 877 - 880.

CUERVO, Claudia *et al.* The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. En: Infect. Genet. Evol. Vol. 6 (2006); p. 401-409.

CUNHA-NETO, Edecio *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. En: J. Clin. Invest. Vol. 98 (1996); p. 1709 – 1712.

DEANE, María P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 79 (1984); p. 513 - 515.

DE LANA, Marta *et al.* Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 81, No. 3 (1986); p. 247 - 253.

_____ *et al.* *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. En: Exp. Parasitol. Vol. 90 (1998); p. 20 - 25.

_____ *et al.* *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. En: Exp. Parasitol. Vol. 96 (2000); p. 61 - 66.

DE DIEGO, José A. *et al.* Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. En: Trop. Med. Int. Health. Vol. 3 (1998); p. 222-233.

DEGRAVE, Wim, *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 27 (1988); p. 63 - 70.

DEVIA, Fanny. Caracterización bioquímica de cepas de *Trypanosoma cruzi* del departamento de Santander y otros departamentos. Bogotá. Tesis de grado Magister en Microbiología. Universidad de los Andes. 1999.

DI NOIA, Javier *et al.* A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. En: J. Exp. Med. Vol. 195 (2002); p. 401 - 413.

DIAS, Joao Carlos. Control of Chagas disease in Brazil . En: Parasitol. Today Vol. 3 (1987); p. 336 - 341.

_____ Chagas disease control in Brazil : which strategy after the attack phase? En: Ann. Soc. Belg. Med. Trop. Vol. 71, suplemento 1 (1991); p. 75 - 86.

_____ Epidemiology of Chagas disease. En: Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine (Welden S *et al.* eds), pp 49-80, International Society of Blood Tranfusion 1992, Brazil .

DIOSQUE, Patricio *et al.* Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina . En: Int. J. Parasitol. Vol. 33 (2003); p. 997 - 1003.

DUTRA, Walderez O. *et al.* The clinical immunology of human Chagas disease. En: Trends Parasitol. Vol. 21 (2005); p. 581 - 587.

EL-SAYED, Najib M. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. En: Science Vol. 309, No. 5733 (2005a); p. 404 - 409.

_____ *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. . En: Science Vol. 309, No. 5733 (2005b); p. 409 - 415.

ESPINOZA, Bertha *et al.* Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. En: Acta Tropica. Vol. 70 (1998); p. 63 - 72.

FERNANDES, Octavio *et al.* Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 58, No. 6 (1998); p. 807 - 811.

FERREIRA, Germano A. *et al.* Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. En: J. Parasitol. Vol. 93 (2007); p. 712 - 714.

FLÓREZ, Oscar *et al.* Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian case-control study. En: Hum. Immunol. Vol 67, No. 9 (2006); p. 741 - 748.

FREITAS, Jorge Marcelo *et al.* Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. En: Int. J. Parasitol. Vol. 35, No. 4 (2005); p. 411 - 417.

_____ *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. En: PLoS Pathog. 2006;2(3):e24.

GAUNT, Michael W., *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. En: Nature Vol. 421 (2003); p. 936 - 939.

GIBSON, Wendy & MILES, Michael. The Karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. En: E.M.B.O. Journal. Vol 5 (1986); p. 1299 - 1305.

GOMES, Yara M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. En: Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 66 (1997); p. 107 - 119.

GUHL, Felipe. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. En: Medicina Buenos Aires. Vol. 59 (1999); p. S103 - S116.

_____ *et al.* Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. En: Arch. Med. Res. Vol. 33, No. 4 (2002); p. 362 - 370.

_____ *et al.* Lessons from a nacional survey of Chagas disease transmission risk in Colombia . En: Trends Parasitol. Vol. 21, No. 6 (2005); p. 259 - 262

GUTIERREZ, Reynaldo *et al.* Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. En: Parasitology Vol. 129 (2004); p. 439 - 444.

HENRIKSSON, Jan *et al.* Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 73 (1995); p. 63 - 74.

HERRERA, Claudia *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia . En: Infect. Genet. Evol. Vol. 7, No. 4 (2007); p. 535 - 539.

HIGO, Hiroo, *et al.* Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Central America and its comparison with South American strains. En: Int. J. Parasitol. Vol. 27 (1997); p. 1369 - 1374.

_____ *et al.* Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America . En: Parasitology Vol. 121 (2000); p. 403 - 408.

HIGO, Hiroo, *et al.* Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. En: Parasitol. Int. Vol. 53 (2004); p. 337 - 344.

JARAMILLO, Claudia Lorena. Detección del polimorfismo genético en cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de humano y vector por medio de ITS-RFLP y RAPD en el departamento de Santander (Colombia). Tesis de grado. Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2004.

JARAMILLO, Nicolás, *et al.* Genetic structure and phylogenetic relationships of Colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 61 (1999); p. 986 - 993.

JUNQUEIRA, Angela C. *et al.* Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. En: Trends Parasitol. Vol. 21 (2005); p. 270 - 272.

KAWASHITA, Silvia Y. *et al.* Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. En: Mol. Biol. Evol. Vol. 18 (2001); p. 2250 - 2259.

KIERSZENBAUM, Felipe. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. En: Clin. Microbiol. Rev. Vol. 12 (1999); p. 210 - 223.

LAGES-SILVA, Eliane *et al.* Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil . En: J. Clin. Microbiol. Vol 44 (2006); p. 2167 - 2171.

LANE, Joshua E. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ polymerase chain reaction. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 98 (2003); p.373 - 376.

LOZANO-KASTEN, Felipe *et al.* Acute Chagas' disease in an 80-year-old woman in Mexico. An anatomicopathological report. En: Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Vol. 26 (1993); p. 231 – 235.

LUQUETTI, Alejandro Ostermayer *et al.* *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil . En: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 80 (1986); p. 462 - 470.

MACEDO, Andréa Mara *et al.* DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 55 (1992); p. 147 - 153.

_____ y PENA, Sergio Danilo. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease. En: Parasitol. Today Vol. 14 (1998); p. 119 - 124.

_____ *et al.* Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 96 (2001); p. 407 - 413.

_____ *et al.* Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. En: Expert. Rev. Mol. Med. Vol. 54 (2002); p. 1 - 16.

_____ y PENA, Sergio Danilo. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 99 (2004); p. 1 - 12.

MACHADO, Carlos A; AYALA, Francisco J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 98 (2001); p. 7396 - 7401.

MARINHO, Claudio *et al.* Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. En: *Infec. Immun.* Vol. 72 (2004); p. 2350 - 2357.

MARQUEZ, De Stefani *et al.* *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. En: *Exp. Parasitol.* Vol. 117 (2007); p. 35 - 42.

MARTINS, Helen *et al.* 2006. *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. En: *Exp. Parasitol.* Vol. 112 (2006); p. 237 – 246.

MEJÍA, Ana María; TRIANA, Omar. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. En: *Biomedica* Vol. 25 (2005); p. 76 - 86.

MENDONÇA, M. *et al.* Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. En: *Parasitology* Vol. 124 (2002); p. 177 - 184.

MILES, Michael *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil . En: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 71 (1977); p. 217 - 225.

_____ *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. En: *Nature* Vol. 272 (1978); p. 819 - 821.

MILES, Michael *et al.* Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile . En: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 78 (1984); p. 526 - 535.

_____ American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies En: B.M.J. Vol. 326 (2003); p. 1444 - 1448.

MOMEN, Hooman. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 94, Suplemento 1 (1999); p. 181 - 184.

MONCAYO, Alvaro. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 98 (2003); 577 - 591.

MONTILLA, Marleny *et al.* Isoenzyme Clustering of Trypanosomatidae Colombian Populations. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 66 (2002); p. 394 - 400.

MOREL, Carlos M. *et al.* Strain and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 77 (1980); p. 6810 - 6814.

MORENO, M. *et al.* Chagas' disease susceptibility/resistance: linkage disequilibrium analysis suggests epistasis between major histocompatibility complex and interleukin-10. En: Tissue Antigens Vol. 64 (2004); p. 18 - 24.

MORTARA, Renato A. *et al.* Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. En: An. Acad. Bras. Cienc. Vol. 77 (2005); p. 77 - 94.

MOSER, David R. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. En: J. Clin. Microbiol. Vol. 27 (1989); p. 1477 - 1482.

MURTA, Silvano M. *et al.* Molecular characterization and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 93 (1998); p. 203 - 214.

MURTHY, Vimal K. *et al.* A PCR amplification of Mini-exon Genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. En: Mol. Cell. Probes Vol 6 (1992); p. 237 - 243.

NEI, Masatoshi & LI, Wen-Hsiung. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 76 (1979); p. 5269 - 5273.

NIETO, Antonio *et al.* HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. En: Tissue Antigens Vol. 55 (2000); p.195 - 198.

OCAMPO-GONZÁLEZ, G. *et al.* Chagasic megaesophagus with positive serology and xenodiagnosis 1993 En: Rev. Gastroenterol. Mex. Vol. 58 (1993); p. 36 - 38.

OLIVEIRA, Riva P. *et al.* An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. En: Parasitol. Today Vol. 13 (1997); p. 196 - 200.

_____ *et al.* Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 95 (1998); p. 3776 - 3780.

OLIVEIRA, Marluce A. *et al.* Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. En: J. Med. Microbiol. Vol. 52 (2003); p. 127 - 135.

PENA, Sergio Danilo & NUNES, A. DNA POP: Program for population study of DNA fingerprints. Minas Gerais Federal University, 1993.

PIMENTA, Juliana R. Análises filogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA. Tesis de doctorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002.

PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. En: Lancet Infect. Dis. Vol. 1 (2001); p. 92 - 100.

PUNUKOLLU, Gopikrishna *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease. En: Int. J. Cardiol. Vol. 115 (2007); p. 279 - 283.

RAMASAWMY, Rajendranath *et al.* The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. En: Clin. Infect. Dis. Vol. 43 (2006); p. 305 - 311.

_____ *et al.* Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. En: Mol. Immunol. Vol. 45 (2008); p. 283 - 288.

RASSI, Anis Jr. *et al.* Chagas' heart disease. En: Clin. Cardiol. Vol. 23 (2000); p. 883 - 889.

REZENDE, Joffre M. & LUQUETTI, A. Chagas disease and the nervous system. En: PAHO Scientific Publication Vol. 547 (1994); p.160 - 183.

RODRÍGUEZ, Pilar *et al.* Variability of 6 Colombian strains of *Trypanosoma cruzi* with restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and random amplification of polymorphic DNA (RAPD). En: Biomedica Vol. 22 (2002); p. 263 - 271.

_____ *et al.* Isoenzymatic Characterization of Colombian Strains of *Trypanosoma cruzi*. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 93 (1998); p. 739 - 740.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, José Manuel *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. En: Immunol. Lett. Vol. 98 (2005); p. 97 - 102.

ROJAS, Winston *et al.* Analysis of polymorphisms in the trypanothione reductase and cruzipain genes in Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. En: Biomedica Vol 27, Suplemento 1 (2007); p. 50 - 63.

ROMANHA, Alvaro J. *et al.* Isoenzyme patterns of *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. En: Comp. Biochem. Physiol. Vol 62 (1979); p. 39 - 142.

ROTUREAU, Brice *et al.* Molecular Epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in French Guiana. En: J. Clin. Microbiol. Vol 44 (2006); p. 468 - 473.

RUIZ-GARCIA, Manuel *et al.* Population genetic analysis of Colombian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by enzyme electrophoretic profiles. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 96 (2001); p. 31 - 51.

RUÍZ-SÁNCHEZ, Rosario *et al.* *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 100 (2005); p. 281 - 283.

SALAZAR, Alexander *et al.* High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. En: Acta Tropica Vol. 100 (2006); p. 110 - 118.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, María del carmen *et al.* Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 101 (2006); p. 733 - 739.

SANGUINETTI, Carlos J. *et al.* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. En: Biotechniques Vol. 17 (1994); p. 914 - 921.

SARAVIA, Nancy G. *et al.* Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia . En: AM. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 36 (1987); p. 59 - 69.

SCHÖNIAN, Gabriele *et al.* Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 106 (2000); p. 239 - 248.

SILVEIRA, José Franco. (2000) *Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi* En: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed Guanabara Koogan, (2a ed.) 127-152.

SIMPSON, Larry. The mitochondrial DNA of kinetoplastid protozoa: genomic organization, replication and evolution. En: Annu. Rev. Microbiol. Vol. 41 (1987); p. 363 - 382.

SOLARI, Aldo *et al.* Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. En: Exp. Parasitol. Vol. 97 (2001); p. 226 - 233.

SOUSA, Octavio E. *et al.* Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 101 (2006); p. 455 - 457.

SOUTO, Ricardo P. & ZINGALES, Bianca. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 62 (1993); p. 45 - 52.

_____ *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 83 (1996); p. 141 - 152.

STUART, Kenneth. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. En: Int. Rev. Citol. Vol. 141 (1992); p. 65 - 88.

STURM, Nancy R. *et al.* Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 33 (1989); p. 205 - 214.

TEIXEIRA, Marta M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic chagasic cardiomyopathy. En: Trop. Med. Int. Health Vol. 2 (2006); p. 294 - 298.

TIBAYRENC, Michel *et al.* Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. En: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 83 (1986); p. 115 - 119.

TIBAYRENC, Michel y AYALA, Francisco J. High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. En: C. R. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 90 (1988) p. 1335 - 1339.

_____ Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. En: Adv. Parasitol. Vol. 36 (1995); p. 47 - 115.

TIBAYRENC, Michel & AYALA, Francisco J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. En: Trends Parasitol. Vol. 18 (2002); p. 405 - 410.

TORO, G. Cecilia; GALANTI, Norbel. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. En: Exp. Cell. Res. Vol. 174 (1988); p. 16 - 24.

TRIANA, Omar *et al.* Genetic variability of Colombian populations of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. En: Biol. Res. Vol. 32 (1999); p. 1 - 10.

_____ *Trypanosoma cruzi*: variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. En: Exp. Parasitol. Vol. 113 (2006); p. 62 - 66.

UMEZAWA, Eufrosina S. *et al.* Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America . En: J. Clin. Microbiol. Vol. 37 (1999); p. 1554 - 1560.

VAGO, Annamaria R. *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. En: Am. J. Pathol. Vol. 149 (1996); p. 2153 - 2159.

VAGO, Annamaria R. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. En: Am. J. Pathol. Vol. 156 (2000); p. 1805 - 1809.

VALLEJO, Gustavo Adolfo *et al.* Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en Colombia y en América. En: Entornos Vol. 13 (2001); p. 9 - 16.

VAN DE PEER, Yves; DE WACHTER, Rupert. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. En: Comput. Appl. Biosci. Vol. 10 (1994); p. 569 - 570.

VIRREIRA, Myrna *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients. En: Acta Tropica Vol. 100 (2006); p. 525 - 255.

WESTENBERGER, Scott J. *et al.* Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. En: Genetics Vol. 171 (2005); p. 527 - 543.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. En: Technical Report Series, 811 (1991). Geneva : WHO. 108p.

_____ Chagas Disease, Venezuela, En: Weekly Epidemiological Record, 35. (1999). Geneva : WHO. 290p.

_____ Control of Chagas disease. En: Technical Report Series, 905 (2002). Geneva : WHO. 120p.

YEO, Matthew *et al.* Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. En: Intern. J. Parasitol. Vol. 35 (2005); p. 225 - 233.

ZAFRA, German *et al.* Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. En: Salud UIS Vol. 32, No. 6 (2004); p. 73 - 79.

ZAFRA, German *et al.* Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. En: Microbes Infect. Vol. 9 (2007a); p. 1049 - 1045.

_____ *et al.* *Trypanosoma cruzi* en pacientes Colombianos con cardiopatía chagásica. En: Bol. Malariol. Salud. Amb. Vol 47, suplemento 1 (2007b); p. 145 – 146.

_____ *et al.* Genetic polymorphisms reveals *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian patients. En: Memorias del XXXIV Annual Meeting on Basic Research In Chagas' Disease. Caxambú: 2007c. p.

ZELEDÓN, Rodrigo & RABINOVICH, Jorge E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. En: Annu. Rev. Entomol. Vol. 26 (1981); p. 101 - 133.

ZINGALES, Bianca *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. En: Intern. J. Parasitol. Vol. 28 (1998); p. 105 - 112.

ANEXO A. Clasificación clínica y electrocardiográfica de la enfermedad de Chagas en estadios según la OMS-OPS

Según la OMS-OPS la clasificación para evaluar la gravedad de la infección chagásica es:

Grado I: Infección chagásica sin compromiso clínico, radiológico ni electrocardiográfico de lesión cardiaca.

Grado II: Infección chagásica con sintomatología de moderada a nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardiaca leve o con alteraciones electrocardiográficas como: extrasistoles, bloqueo auriculo-ventricular incompleto, bloqueo completo o incompleto de la rama derecha del haz de His, bloqueo completo o incompleto de la rama izquierda del haz de His, alteraciones primarias de repolarización.

Grado III: Infección chagásica con sintomatología evidente, hipertrofia cardiaca moderada y alteraciones electrocardiográficas como: bloqueo completo de la rama derecha del haz de His con desvío del eje eléctrico medio QRS para la izquierda (hemibloqueo anterior izquierdo), zonas eléctricamente inactivas, bloqueo, auriculo-ventricular completo, fibrilación o “flutter” auricular.

Grado IV: Infección chagásica con sintomatología muy pronunciada y con insuficiencia cardiaca. Estudio radiológico que muestre cardiomegalia extrema o electrocardiograma con alteraciones graves o múltiples (arritmias complejas y graves zonas eléctricamente inactivas).

ANEXO B. Resumen de presentación en XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, 2007, Isla de Margarita, Venezuela.

FLAP 2007 - Isla de Margarita, Venezuela

gen HSP70 de *T. rangeli*, cepa H14, tiene un tamaño de 2.500 pb, se encuentra repetido con al menos 6 copias organizadas en tándem, las cuales presentan polimorfismo de restricción entre ellas y con los mismos genes de *T. rangeli* y *T. cruzi*. El locus HSP70 se ubica en un único cromosoma de 1.174 kb, la región codificante es de 2.010 pb y presenta una identidad del 99% con los mismos genes de la cepa Tre KP1(-) de *T. rangeli* y del 93% con su homólogo en *T. cruzi*. El gen hsp70 de H14 origina un transcrito de 2.300 nts y una proteína de 669 aa con un peso molecular teórico de 72,8 kDa y un punto isoeléctrico de 5,48, la cual presenta 3 motivos característicos de las proteínas HSP70. Conclusiones: Se caracterizó el gen HSP70 en la cepa H14, KP1(+), de *T. rangeli*, cuya organización genómica, secuencia de nucleótidos y de aminoácidos presenta una alta identidad con lo reportado para la cepa Tre, KP1(-) del mismo parásito y para *T. cruzi*.

P061. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN *msp2* PROVENIENTE DE DOS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Anaplasma marginale* SECUENCE COMPARATION OF *msp2* GENE FROM TWO VENEZUELAN ISOLATES OF *Anaplasma marginale*.

Eleizalde Aponte, Mariana Carolina¹; Reyna-Bello, A.²

¹Universidad Simón Rodríguez-IDECYT-CEVIB / Universidad Simón Bolívar; ²Universidad Simón Rodríguez-IDECYT-CEBIV

Anaplasma marginale, agente causal de la anaplasmosis bovina, es una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia Anaplasmataceae, orden de las Rickettsias. Esta bacteria actúa como parásito obligatorio al requerir invadir los eritrocitos para su multiplicación y supervivencia, causando disminución en la salud y productividad del rebaño. La permanencia de la bacteria en el torrente sanguíneo del hospedador se debe al mecanismo de variación antigénica de la proteína MSP2 codificada por el gen *msp2*, a través de un proceso de recombinación segmental de genes. Este gen está constituido por dos regiones conservadas que flanquean una región central hipervariable donde se lleva a cabo el proceso de recombinación. En consecuencia, las investigaciones se han avocado al estudio del gen *msp2*, pues además de mediar la evasión de la bacteria al sistema inmune, se ha reportado que las regiones conservadas poseen epítopes de reconocimiento de linfocitos T. Con la finalidad de confirmar que la secuencia de las regiones flanqueantes son conservadas también en nuestro país se procedió a aislar el gen *msp2* partiendo de dos aislados de *Anaplasma marginale* provenientes del Estado Miranda y del Estado Aragua, obteniendo como resultado que las secuencias nucleotídicas de ambos aislados difieren no solo en la región central como se esperaba sino en las regiones flanqueantes, lo que pudiese influir en cambios de los epítopes de reconocimiento de linfocitos. Palabras clave: *A. marginale*, *msp2*, variación antigénica, anaplasmosis.

P062. *Trypanosoma cruzi* EN PACIENTES COLOMBIANOS CON CARDIOPATÍA CHAGÁSICA (*Trypanosoma cruzi* IN CHAGASIC-CARDIOMYOPATHIC COLOMBIAN PATIENTS).

Zafra, G.¹; González, C. I.¹; Valadares, H. M.²; Macedo, A. M.²

¹Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Universidad Industrial de Santander; ²Departamento de Bioquímica e Inmunología, Universidade Federal de Minas Gerais.

Introducción: *Trypanosoma cruzi* comprende poblaciones complejas con grandes diferencias en sus características biológicas y genéticas. Las caracterizaciones moleculares a partir de aislados de pacientes chagasicos, muestran a *T. cruzi* I como el único grupo que causa cardiomiopatía chagásica en Colombia y otros países del norte de Suramérica y América central, en contraste con algunos países del sur del continente en donde *T. cruzi* II se encuentra más asociado con el desarrollo de la enfermedad. En Colombia la totalidad de las cepas aisladas a partir de hemocultivo pertenece al grupo *T. cruzi* I mientras que a nivel de vectores y reservorios un 92% corresponde a este grupo. Existen pocos reportes de caracterización genética en tejidos humanos, principalmente en Brasil en donde el grupo identificado en la mayoría de los pacientes con cardiomiopatía chagásica es *T. cruzi* II. En Colombia no se han realizado estudios en tejidos y no hay reportes que indiquen

la presencia de *T. cruzi* II en pacientes con cardiomiopatía chagásica. Objetivo y metodología: El objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente los parásitos *T. cruzi* presentes en tejidos de 11 individuos con cardiomiopatía chagásica provenientes del departamento de Santander, Colombia. Para esto, se tipificaron los genes del mini-exon, el dominio D7 del rRNA 24sa y el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa II. Resultados: Los resultados mostraron la presencia de *T. cruzi* I en 9 de los 11 pacientes analizados y en 3 se detectó *T. cruzi* II. Conclusiones: Este es el primer estudio realizado en Colombia a partir de tejidos de pacientes con cardiomiopatía chagásica y es el primer reporte en la zona norte de Suramérica que describe la presencia de *T. cruzi* II y su asociación con la patología de la enfermedad. Esto confirma la circulación de ambos grupos del parásito en Colombia y demuestra que no solo *T. cruzi* I es el causante de la cardiomiopatía chagásica, corroborando hallazgos previos de nuestro grupo que demuestran la presencia de *T. cruzi* II en sangre de pacientes asintomáticos y crónicos/sintomáticos colombianos. Estudios posteriores son necesarios para conocer más a fondo las implicaciones epidemiológicas y distribución geográfica de *T. cruzi* II en Colombia, y si más subgrupos circulan y están implicados en la etiología de la enfermedad.

P063. POLIMORFISMO GENÓMICO EN EL GEN MSP3alfa DE PLASMODIUM VIVAX EN MUESTRAS DE DOS LOCALIDADES COLOMBIANAS.

Guerra Vega, Angela Patricia; Cristiano, F.A.; Perez, M. A.; Nicholls, R. S. Instituto Nacional de Salud.

Introducción: La malaria es un problema de salud pública en Colombia, siendo *Plasmodium vivax* la especie que más casos produce. Las infecciones maláricas están conformadas generalmente por múltiples poblaciones de parásitos y los marcadores moleculares son las herramientas más utilizadas para investigar la diversidad genética de los parásitos. Objetivo: Evaluar la utilidad del marcador molecular pvmsp-3alfa en la diferenciación genética de *P. vivax* circulante en dos localidades de Colombia. Materiales y métodos: Se analizó la región polimórfica del gen msp-3alfa mediante el método de PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) de 56 muestras de pacientes infectados con *P. vivax* procedentes del municipio de Tierralta, Córdoba y 4 muestras de Puerto Inirida, Guainía. Se examinó el polimorfismo de tamaño por PCR y el de secuencia mediante el uso de las enzimas de restricción Alu I y Hha I. Se establecieron patrones de restricción para cada enzima y sus respectivas frecuencias. Las infecciones se clasificaron en simples o mixtas con base en la sumatoria de los fragmentos de restricción encontrados por muestra. Resultados: se encontraron tres tamaños distintos del gen pvmsp-3alfa, siendo el tipo A (1900 pb) el más frecuente 96.6 %. Para los tipos B (1500 pb) y C (1100 pb) la frecuencia fue de 1.7% y 3.4% respectivamente. Al analizar el polimorfismo de secuencia usando la enzima Alu I se encontraron 7 patrones de restricción y con la enzima Hha I se observaron 9. Al combinar los patrones de ambas enzimas se obtuvieron 12 combinaciones diferentes, lo que sugiere que *Plasmodium vivax* presenta una gran variabilidad en la secuencia de este gen. Para la enzima Alu I, el patrón denominado PA1 se encontró en el 23.5% de las muestras y para la enzima Hha I, el patrón H3 se encontró en un 32.3 %. El protocolo combinado de PCR-RFLP usando 2 enzimas permitió detectar mayor cantidad de infecciones mixtas (41.3%) comparado con una sola enzima. Conclusiones: El gen msp-3alfa de *P. vivax* exhibió un gran polimorfismo de secuencia, aspecto que se evidencia por los numerosos patrones de restricción encontrados. Lo anterior sugiere que este gen puede usarse en nuestro país como marcador molecular para genotipificar *Plasmodium vivax* y que el uso de varias enzimas de restricción contribuye a un mejor análisis de la diversidad.

P064. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES MITOCONDRIALES COX1 Y CITB, DE ALGUNAS ESPECIES DE CÉSTODOS.

Guzmán Lotero, Edith Liliana¹; Londoño-Orozco, A.²; Castaño Osorio, J. C.³

¹Universidad de Sucre; ²Grupo Plaguicidas y Salud. Universidad del Quindío; ³Grupo Inmunología Molecular Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

ANEXO C. Resumen de presentación en IX Simposio PECET: Avances en la investigación de enfermedades tropicales, 2008, Medellín.



IX SIMPOSIO PECET: AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES TROPICALES

ENFERMEDADES TROPICALES

Expositor: Germán Alexis Zafra Sierra

Institución: Universidad Industrial de Santander

Dirección: Carrera 32 No. 29-31

País/Ciudad/: Bucaramanga/Santander

Correo electrónico: gzafra@gmail.com

Modalidad: Poster

Tema: Biología Molecular

Título:

Infección mixta por *Trypanosoma cruzi* I y II en tejidos humanos: presentación de un caso

Germán Zafra, Julio Cesar Mantilla, Clara Isabel González Rugeles

Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. Universidad Industrial de Santander. Colombia

Introducción: La enfermedad de Chagas presenta un curso clínico variable que incluye alteraciones cardíacas, digestivas y neurológicas. En centro y norte de Suramérica las manifestaciones gastrointestinales son raras y la forma de presentación predominante es la cardiopatía chagásica. Esta heterogeneidad clínica podría estar influenciada por la variabilidad genética del parásito, la cual podría definir el tropismo diferencial de los distintos linajes del parásito hacia los tejidos. En Colombia no se han realizados estudios para caracterizar genéticamente el parásito *T. cruzi* presente en tejidos de pacientes con la enfermedad, por ello en este trabajo se analizaron los tejidos de un paciente de Santander con diagnóstico compatible con la enfermedad de Chagas, con el fin de detectar el parásito y caracterizarlo genéticamente.

Materiales y Métodos: Se realizó la detección del kDNA y nDNA de *T. cruzi* mediante la metodología de PCR, así como la genotipificación de las regiones variables de los genes del mini-exon, rRNA 24sq, rRNA 18s y el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa II (*COII*), con el fin de clasificar los parásitos detectados en cada uno de los linajes previamente descritos.

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET

Sede de Investigación Universitaria -SIU-

Calle 62 #52-59 laboratorio 632 | Teléfono: (57+4)219 65 02

simposiopecet2008@gmail.com

<http://medicina.udea.edu.co/pecet/simposio/index.html>

Medellín, Colombia

2008



Resultados: El kDNA y nDNA de *T. cruzi* pudo ser detectado en tejido cardíaco y en esófago, mientras que en las muestras de colon e hígado no se obtuvo amplificación. La posterior caracterización genética de los parásitos detectados mostró la presencia del linaje *T. cruzi* IIb en corazón y *T. cruzi* I en esófago.

Conclusiones: En este estudio reportamos por primera vez una infección dual con dos linajes diferentes de *T. cruzi* en distintos tejidos de un paciente chagásico proveniente de Santander. Este hallazgo demuestra que ambos linajes principales de *T. cruzi* circulan y son responsables de las fases crónicas de la enfermedad de Chagas en nuestro país, corroborando hallazgos previos de nuestro grupo que demuestran la presencia de ambos linajes en sangre de pacientes chagásicos provenientes de Santander. Aunque en Colombia se presume una prevalencia más alta de pacientes infectados con *T. cruzi* I, claramente existe una circulación del linaje IIb y posiblemente otros sublinajes en el mismo ciclo biológico. Se hace necesario conocer más a fondo la distribución geográfica de los distintos linajes de *T. cruzi* en Colombia, y si más subgrupos circulan y están implicados en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET
Sede de Investigación Universitaria -SIU-
Calle 62 #52-59 laboratorio 632 | Teléfono: (57+4)219 65 02
simposiopecet2008@gmail.com
<http://medicina.udea.edu.co/pecet/simposio/index.html>
Medellín, Colombia
2008