

**ESTUDIO DE LA INSERCIÓN DE kDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN EL
GENOMA DE PACIENTES CHAGÁSICOS**

CAROLINA CHACÍN PEÑALOZA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**ESTUDIO DE LA INSERCIÓN DE kDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN EL
GENOMA DE PACIENTES CHAGÁSICOS**

CAROLINA CHACÍN PEÑALOZA

**Trabajo de grado para optar el título de
Químico**

**Director
RODRIGO TORRES SÁEZ
Bioquímico, PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo lo que me han regalado

A los Doctores Clara Isabel González y Rodrigo Torres por acogerme en sus respectivos Grupos de Investigación y por todo el conocimiento que me han transmitido

A Germán Zafra por iniciarme en el fascinante mundo de la Biología Molecular

Al Doctor Aldo Solaris por todo lo que me enseñó sobre técnicas de marcaje enzimático

A la Doctora Carmen Cecilia Cabrales por su colaboración en la realización de este proyecto

A todos los compañeros de ambos Grupos de Investigación, especialmente a Martha

Lucía por realizar un cultivo de *Trypanosoma cruzi*, y a Libeth por ser tan amable

A todos mis compañeros químicos Yeni, Nelson, Eddy Carolina, José Gregorio, Suguey,

Jenny, Laura Teresa, Johan, Clara Nathalia, German, Adriana, María Camila, Josué,

John Hervin, Ángela, Rocío, Oveimar y sobre todo a Lina

A Fredy por siempre escucharme cuando lo necesito

CONTENIDO

	pág
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.2 JUSTIFICACIÓN	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1 GENERALIDADES DEL METABOLISMO DEL ADN	17
3.1.1 Dogma central de la biología molecular	
3.1.2 Recombinación de DNA y transposición génica	17
3.1.3 Transferencia genética horizontal	18
3.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS	19
3.2.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas	19
3.2.2 Clínica de la enfermedad de Chagas	19
3.2.3 Clasificación y ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
3.2.4 Diversidad genética del <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.2.5 kDNA del <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.2.6 Tripanosomiasis americana en Colombia	25
3.3 HIPÓTESIS DE LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS	27
3.3.1 Hipótesis de la autoinmunidad	27
3.3.2 Hipótesis de la persistencia del parásito	28
3.3.3 Hipótesis de la genética del parásito y/o del hospedero	29
3.3.4 Hipótesis de la inserción de kDNA del <i>Trypanosoma cruzi</i> al hospedero	29
3.4 TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO	32
3.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa	32
3.4.2 Electroforesis en gel de agarosa	34
3.4.3 Hibridación con sondas	35

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
4.1 MUESTRAS DE ESTUDIO	41
4.2 AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	42
4.2.1 PCR con los cebadores Tcz1 y Tcz2	42
4.2.2 PCR con los cebadores S35 y S36	43
4.2.3 Electroforesis de las muestras de ADN amplificadas por PCR	44
4.3 DOBLE DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>BamHI</i> Y <i>EcoRI</i>	47
4.4 TRANSFERENCIA CAPILAR DE LAS MUESTRAS DE ADN DESDE EL GEL DE AGAROSA A UNA MEMBRANA DE NYLON	49
4.5 MARCAJE DEL OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO kCR CON DIGOXIGENINA, HIBRIDACIÓN DEL MISMO CON LAS MUESTRAS DE ADN EN LAS MEMBRANAS DE NYLON Y DETECCIÓN DE DICHA HIBRIDACIÓN MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA	51
4.5.1 Marcaje enzimático aleatorio del oligonucleótido sintético kCR con digoxigenina	51
4.5.2 Hibridación de la sonda DIG-kCR con las muestras de ADN en las membranas de nylon	51
4.5.3 Detección de la hibridación mediante quimioluminiscencia	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1 RESULTADOS DE LA PCR DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CON LOS CEBADORES Tcz1/Tcz2	55
5.2 RESULTADOS DE LA PCR DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CON LOS CEBADORES S35/S36	56
5.3 RESULTADOS DE LA DOBLE DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>BamHI</i> Y <i>EcoRI</i>	58
5.4 RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN EN LAS MEMBRANA DE NYLON CON LA SONDA DIG-kCR	59

6. CONCLUSIONES	63
7. RECOMENDACIONES	64
8. BIBLIOGRAFÍA	65
9. ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Características de las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	35
Tabla 2. Preparación de la mezcla de PCR con los cebadores Tcz1 y Tcz2	41
Tabla 3. Preparación de la mezcla de PCR con los cebadores S35 y S36	43
Tabla 4. Preparación de la mezcla de doble digestión de ADN genómico	46
Tabla 5. Resultados obtenidos con la PCR Tcz1/Tcz2	54
Tabla 6. Resultados obtenidos con la PCR S35/S36	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Diferentes morfologías del <i>T. cruzi</i>	20
Figura 2. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i>	20
Figura 3. Estructura química del dímero constituyente de la agarosa	33
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa	34
Figura 5. Montaje de transferencia de ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nylon	36
Figura 6. Estructura química de la digoxigenina	37
Figura 7. Estructura química del DIG-Dutp	38
Figura 8. Reacción quimioluminiscente del CSPD	39
Figura 9. Vista de la muestras en el termociclador	42
Figura 10. Vista del sembrado de las muestras en el gel de agarosa	44
Figura 11. Vista del gel de agarosa al finalizar la electroforesis	44
Figura 12. Vista lateral del montaje de transferencia de ADN	49
Figura 13. Vista de la membrana luego de la transferencia capilar	49
Figura 14. Vista de la membrana durante el proceso de hibridación	51
Figura 15. Vista de la membrana en el cassette	53
Figura 16. Vista del revelado de la película de rayos X	53
Figura 17. Fotografía del gel de agarosa con las muestras amplificadas por PCR con el par de iniciadores S35/S36	55
Figura 18. Fotografía del gel de agarosa con las muestras de ADN digeridas	57
Figura 19. Imagen de la autorradiografía de hibridación	58
Figura 20. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana correspondiente al gel de agarosa de la figura 18	59
Figura 21. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana con muestras de ADN genómico del parásito, digerido y sin digerir	60

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA INSERCIÓN DE kDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN EL GENOMA DE PACIENTES CHAGÁSICOS*

AUTOR: CHACÍN PEÑALOZA, Carolina

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, kDNA, PCR, Southern blot**

DESCRIPCIÓN:

La enfermedad de Chagas afecta cerca de 20 millones de personas y es una patología restringida al continente americano. Esta enfermedad de carácter crónico es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* del cual, en la actualidad se han definido dos poblaciones: *Trypanosoma cruzi I* y *Trypanosoma cruzi II*, con características particulares relacionadas con la distribución geográfica y el tipo de manifestaciones clínicas.

Este estudio consistió en determinar si ocurre inserción del kDNA del *Trypanosoma cruzi I* en el genoma de pacientes chagásicos del área endémica de Santander (Colombia) a partir de muestras de ADN extraído de sangre periférica. Se tuvieron en cuenta 130 muestras provenientes de pacientes sintomáticos, así como 50 muestras provenientes de pacientes asintomáticos, las cuales fueron analizadas mediante la técnica de PCR con los pares de cebadores Tcz1/Tcz2 y S35/S36 con el fin de identificar la presencia del parásito en dichas muestras.

Posteriormente se tomaron las muestras que resultaron positivas de la PCR S35/S36, para realizar una doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, luego se realizó la separación de los fragmentos de ADN obtenidos en un gel de agarosa, y posteriormente fueron transferidos a una membrana de nylon e hibridados con un oligonucleótido sintético marcado enzimáticamente con digoxigenina.

Ninguna de las muestras que se tuvieron en cuenta en este estudio hibridó con dicho oligonucleótido, es decir ninguna de estas muestras posee aquella secuencia del gen del parásito insertado en el genoma del paciente chagásico.

* Trabajo de grado para optar al título de Químico.

** Director: Rodrigo Torres Sáez, PhD. Escuela de Química, Facultad de Ciencias.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF *TRYPANOSOMA CRUZI*'S kDNA INSERTION INTO THE GENOME OF CHAGASIC PATIENTS*

AUTHOR: CHACÍN PEÑALOZA, Carolina

KEY WORDS: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, kDNA, PCR, Southern blot**

DESCRIPTION:

Chagas disease affects nearly 20 million people and it is a pathology restricted to the american continent. This disease has a chronic character and it is caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite, which is actually classified in two major lineages: *Trypanosoma cruzi I* and *Trypanosoma cruzi II*. These lineages have particular features related with geographic distribution and clinical manifestations.

This study consisted in determine if the kDNA of *Trypanosoma cruzi I* is getting inserted into the genome of chagasic patients from the endemic area of Santander (Colombia), specifically in DNA extracted from samples of periphery blood. 130 samples from symptomatic patients and 50 samples from asymptomatic patients were considered for this study; all of them were analyzed by PCR technique with primers Tcz1/Tcz2 and S35/S36 with the purpose of identify the parasite's presence in these samples.

The samples that resulted positive of the PCR S35/S36 were double digested with *EcoRI* and *BamHI* restriction enzymes, the DNA fragments obtained were separated in an agarose gel, transferred to a nylon membrane and hybridized with a digoxigenin marked synthetic oligonucleotide.

None of the samples of this study hybridized with this oligonucleotide, which means that none of them possess this parasite's gene sequence inserted in the genome of the chagasic patient.

* Paperwork required to obtain Chemist title

** Director: Rodrigo Torres Sáez, PhD. Chemistry School, Science Faculty

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas afecta cerca de 20 millones de personas y es una patología restringida al continente americano. Esta enfermedad de carácter crónico es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* del cual, en la actualidad se han definido dos poblaciones: *Trypanosoma cruzi I* y *Trypanosoma cruzi II*, con características particulares relacionadas con la distribución geográfica (el *T. cruzi II* es propio de regiones comprendidas en los países de Brasil y Argentina, mientras que el *T. cruzi I* es característico de regiones en los países de Colombia y Venezuela) y el tipo de manifestaciones clínicas.

El *Trypanosoma cruzi* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, la cual está incluida en el orden *Kinetoplastida* que junto con los euglenoides representan el linaje más antiguo de los organismos eucarióticos que contienen mitocondria. Estos organismos del orden *Kinetoplastida* se caracterizan precisamente por poseer una estructura de DNA extranuclear denominada kinetoplasto o kDNA, el cual está conformado por una red de maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos contienen los genes que codifican subunidades de las enzimas implicadas en el proceso de respiración y los minicírculos contienen genes que codifican pequeños RNA's, los cuales a su vez dirigen el proceso de edición de los RNA's mensajeros codificados por los maxicírculos.

Una poderosa fuente de cambio en los genomas eucarióticos está dado por los elementos transponibles (ET's), estos elementos tienen una alta distribución en la naturaleza con un alto número de copias y algunos se han encontrado involucrados en regulación de la transcripción génica. En humanos se han descrito asociados a diferentes tipos de neoplasias. En *T. cruzi* se han descrito estos elementos y en los últimos años se ha reportado la integración de kDNA del *Trypanosoma cruzi II* en el genoma del hospedero, asociado con la presencia de elementos transponibles, con las consecuencias que esto representa por su potencial papel en la regulación de la expresión y en el cambio fenotípico de la célula que podría estar relacionado con la patogenicidad de la enfermedad de Chagas durante la fase crónica de la misma.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto busca determinar si ocurre inserción del kDNA del *Trypanosoma cruzi I* en el genoma de pacientes chagásicos del área endémica de Santander (Colombia) a partir de muestras de sangre. La finalidad de este trabajo es avanzar en la elucidación de las interacciones que ocurren a nivel molecular entre los genes de pacientes humanos y los del parásito. La posibilidad de la inserción de ADN del parásito en el genoma del hospedero y la posterior identificación del sitio de inserción son fundamentales, por el posible papel que podrían jugar estos elementos en la patogénesis de la enfermedad o en la reactivación de la misma. Este hallazgo sólo ha sido reportado por un grupo de investigación de Brasil, y esto debe ser confirmado por otros grupos de investigación. Estas razones unidas al hecho de contar con las muestras y la tecnología necesarias para llevar esto a cabo, conlleva a su realización dentro del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la inserción del kDNA del *Trypanosoma cruzi* en el genoma de muestras biológicas de individuos chagásicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

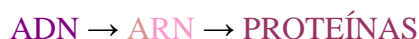
- Identificar la presencia del *Trypanosoma cruzi* en muestras de ADN provenientes de pacientes chagásicos.
- Determinar la inserción del kDNA del parásito en aquellas muestras que revelen la presencia del mismo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DEL METABOLISMO DEL ADN

3.1.1 Dogma central de la biología molecular

El genoma de cualquier individuo está contenido en los cromosomas y a su vez los cromosomas son ovillos de ADN. Cada secuencia de tres pares de bases codifica un aminoácido, y de las combinaciones de éstos se forman las proteínas. Este proceso constituye el denominado “dogma central de la biología molecular”, sintetizado en el siguiente esquema:



El ADN pasa por un proceso de transcripción a ARN y mediante la traducción de este último se obtiene una secuencia de aminoácidos constituyendo una proteína. La expresión de esta información genética en los organismos eucariotas es selectiva y es diferencial, dependiendo del tejido y el estado de desarrollo del organismo [NELSON, COX; 2005].

3.1.2 Recombinación de ADN y transposición génica

Existen al menos tres clases: recombinación homóloga, recombinación de sitio específico y movilidad de elementos transponibles de ADN. La primera implica el intercambio de secciones que contengan una secuencia nucleotídica muy similar entre dos moléculas de ADN, siendo ésta la razón de que los cromosomas eucarióticos se organicen por pares [ALBERTS, 2003]. La movilidad de elementos transponibles generalmente implica la inserción de dichos elementos, denominados transposones, en un proceso catalizado por sustancias enzimáticas específicas de la recombinación de ADN.

Estos transposones son segmentos de ADN, que tienen la facultad de “saltar” de un lugar específico de un cromosoma hacia otro sitio que puede ser dentro del mismo cromosoma o incluso en otro cromosoma. Existen dos clases de transposones: los

simples y los replicativos, los primeros se caracterizan por trasladarse de un sitio a otro dentro del genoma, mientras que los segundos realizan un proceso de replicación, siendo así que la nueva copia se transpone dejando una réplica tras de sí en su sitio de origen, lo cual conlleva a una acumulación creciente de elementos genéticos [OCHOA, LELOIR, ORÓ, SOLS; 1988].

3.1.3 Transferencia genética horizontal

La transferencia de información genética puede también suceder entre individuos de diferentes especies y recibe el nombre de transferencia horizontal a diferencia de la vertical que ocurre de célula progenitora a célula hija. El primer caso estudiado fue la interacción del virus bacteriófago λ con la bacteria *Escherichia coli*. Se observó que al insertarse el ADN del virus en la bacteria podía ocurrir dos fenómenos. En primer lugar, el ADN del virus procedía a producir múltiples copias de sí mismo, aprovechándose de toda la maquinaria enzimática de la bacteria para realizar este proceso de replicación de ADN y conllevando a la destrucción de la bacteria; o en segunda instancia, el ADN del virus podía simplemente insertarse en el cromosoma de la bacteria y ser así replicado en conjunto con éste en el momento en que la bacteria diera inicio a su ciclo normal de división celular. El virus podía nuevamente pasar al primer ciclo, denominado lítico y en su proceso de escisión del ADN bacteriano podría arrastrar ADN de la bacteria que sería transferido a la nueva célula infectada en un proceso denominado transducción [OCHOA, LELOIR, ORÓ, SOLS; 1988].

3.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.2.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Existen reservorios mamíferos y el parásito es transmitido por insectos vectores. Entre los vectores más comunes están los artrópodos triatomíneos de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*. Éstos se infectan al picar a un mamífero infectado. Existen múltiples formas de adquirir la enfermedad de Chagas, además de la transmisión contaminativa por vectores. Es posible infectarse a través de transfusiones sanguíneas o transplantes de órganos, así como de madre a feto. Ocasionalmente, la infección se adquiere mediante la ingesta de material contaminado con el parásito, siendo así que los mamíferos que actúan como reservorio frecuentemente adquieren la enfermedad al comerse los insectos infectados [CEVALLOS, HERNÁNDEZ; 2003].

3.2.2 Clínica de la enfermedad de Chagas

La fase inicial de la infección generalmente pasa desapercibida en la mayoría de los individuos, sólo un pequeño porcentaje desarrolla una etapa aguda en la cual se encuentra una alta parasitemia. Los parásitos se diseminan a través de la circulación sanguínea, infectando principalmente células musculares cardíacas, neuronas y tejido glial (células de soporte del sistema nervioso). La ruptura de células parasitadas desencadena una respuesta inflamatoria. Posteriormente, con el desarrollo de la respuesta inmune específica, el número de parásitos disminuye drásticamente, así comienza la etapa indeterminada de la enfermedad (entre 8 y 10 semanas después de la infección).

A pesar de la aparición de la respuesta inmune, las personas permanecen infectadas de por vida con parásitos tanto en la sangre como en los tejidos. En éstos, la infección puede ser rápidamente activada durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunosupresión severa. Aproximadamente el 30% presentan complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo, entre 10- y 30 años después de la infección inicial. Durante esta etapa crónica puede haber gran daño celular en ausencia de una directa invasión de parásitos. Esta disparidad entre la cantidad de parásitos presentes en las

células y el grado de daño celular ha causado gran controversia en lo que respecta a los mecanismos que determinan el deterioro de las células en el transcurso de la enfermedad. La última hipótesis en la que la mayoría está de acuerdo es que se requiere la presencia del parásito para mantener una respuesta inflamatoria crónica responsable del daño tisular, el cual a su vez conlleva a la liberación de moléculas propias que generan la presencia de autoanticuerpos [CEVALLOS, HERNÁNDEZ; 2003].

3.2.3 Clasificación y ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

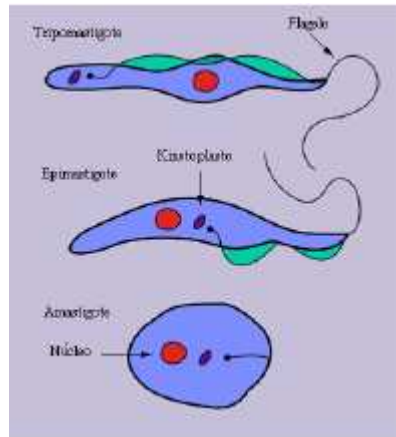
El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario perteneciente al super reino Eukarya, clase Euglenozoa, orden Kinetoplastida. Los miembros de esta orden están caracterizados por la presencia de un organelo peculiar que los define, llamado kinetoplasto o kDNA.

El género *Trypanosoma* se caracteriza por utilizar dos hospederos, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida. En el caso particular del *T. cruzi*, éste se caracteriza por ser un parásito intracelular del hospedero vertebrado. Existen 4 presentaciones morfológicas principales de los tripanosomas, según la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y la presencia o ausencia de una membrana ondulante:

1. *Amastigote*: El kinetoplasto tiene forma esférica y no hay flagelo libre. Esta forma del parásito se presenta en los tejidos de los vectores y animales infectados.
2. *Epimastigote*: En el intestino del insecto adquieren esta morfología, la cual se caracteriza por presentar el kinetoplasto localizado en la parte media del microorganismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la del tripomastigote.
3. *Tripomastigote*: El kinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante y emergiendo de forma libre en su extremo anterior. Así se presenta en la sangre de los mamíferos infectados.
4. *Promastigote*: Tiene el kinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante [DAVILA, LUKES; 2003].

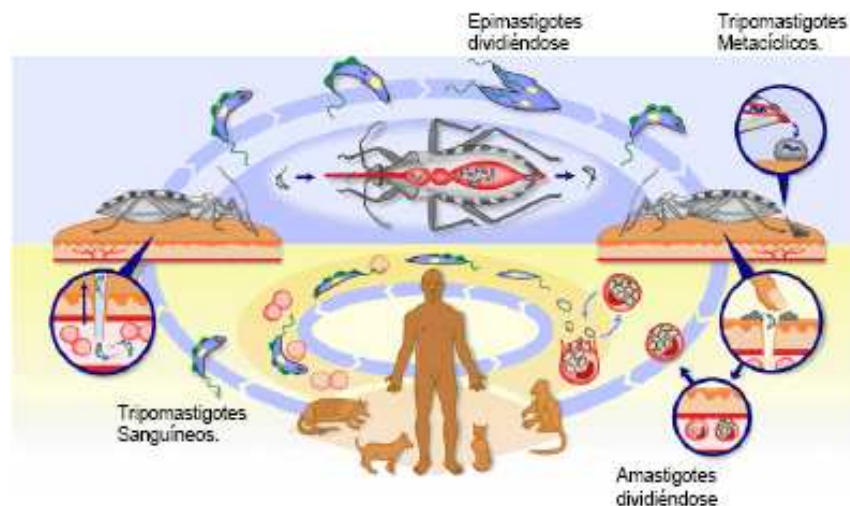
En la siguiente figura se muestran las diferentes morfologías del parásito:

Figura 1. Diferentes morfologías del *T. cruzi*. Tomado de [http://therion.dna.uba.ar/bmei/clases_06/Clase%2020\(kinetos%20intro\).pdf](http://therion.dna.uba.ar/bmei/clases_06/Clase%2020(kinetos%20intro).pdf).



El ciclo de vida del parásito puede resumirse en lo que demuestra la siguiente figura:

Figura 2. Ciclo de vida del *T. cruzi*. Tomado de [http://therion.dna.uba.ar/bmei/clases_06/Clase%2020\(kinetos%20intro\).pdf](http://therion.dna.uba.ar/bmei/clases_06/Clase%2020(kinetos%20intro).pdf).



Tal y como lo muestra la figura, el triatómico en la parte izquierda ingiere la sangre infectada con tripomastigotes, luego estos pasan a la etapa de epimastigotes en el intestino medio del vector, y ahí se reproducen, para después transformarse en tripomastigotes nuevamente, en el intestino posterior del vector. En el momento en que el vector ingiere sangre, él defeca de manera simultánea, depositando de esta manera los

tripomastigotes presentes en sus heces y de ahí dichos tripomastigotes tienen acceso al torrente sanguíneo del hospedero mamífero. El sistema inmune del mamífero ataca los tripomastigotes, por lo que ellos se refugian en las células de los tejidos musculares o digestivos, para luego pasar a la etapa de amastigotes. Posteriormente el amastigote se reproduce mediante fisión binaria y en el momento en que la célula infectada está saturada de amastigotes, éstos son liberados al torrente sanguíneo donde vuelven a ser tripomastigotes, pero éstos a su vez pueden repetir el ciclo de infectar otras células y transformarse en la forma intracelular de amastigote.

3.2.4 Diversidad genética del *Trypanosoma cruzi*

A pesar de tener un modo de replicación predominantemente clonal, las diferencias genotípicas y fenotípicas entre los linajes de *T. cruzi* sugieren múltiples eventos de recombinación genética en su historia evolutiva. Bajo estricta evolución clonal, las secuencias de genes independientes tendrían la misma historia y se esperaría que mostrarán el mismo patrón de descenso, mientras que incongruencias significativas entre ellos indicaría que ha ocurrido intercambio genético entre los genomas [GAUNT, YEO, FRAME; 2003].

Las poblaciones naturales de *T. cruzi* exhiben una heterogeneidad genética considerable, tal que se han ordenado en dos linajes filogenéticos primarios, *T. cruzi I* y *T. cruzi II*, según el análisis de rRNA. Esta clasificación se apoya además sobre la base de fenotipos enzimáticos, perfiles de ADN, secuencias de miniexones y análisis de microsatélites [PIMENTA, 2002]. Varios marcadores moleculares permiten la distinción entre los dos linajes principales, dichos marcadores incluyen el gen ribosomal 24S y los genes miniexones [ZINGALES, STOLF, et al; 1999].

Estudios basados en las técnicas de Electroforesis de Enzimas MultiLocus (MLEE) y Amplificación Aleatoria de Polimorfismos de ADN (RAPD) han llevado a su vez a la clasificación de las poblaciones correspondientes al linaje II en cinco grupos: *T. cruzi Ila, I Ib, I Ic, I Id, I Ie*. Cada uno de los seis grupos de *T. cruzi*, (*T. cruzi I, I Ia, I Ib, I Ic, I Id* y *I Ie*) presentan a su vez múltiples cepas que son características de la región geográfica en la que se encuentran, y cada cepa puede contener una gran variedad de clones [BARNABE, BRISSE, et al; 2000].

La diversidad clonal del *T. cruzi* tiene una influencia directa sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Cuando las diferentes cepas son comparadas en el laboratorio se observan polimorfismos en sus perfiles genéticos. Además de lo anterior, otro aspecto que resulta intrigante es la distribución geográfica de los diferentes tipos de patología de la enfermedad de Chagas, lo cual puede estar directamente relacionado con la diversidad genética del parásito, del hospedero o incluso de ambos. En el caso de los países que se encuentran más hacia al sur del continente americano, tales como Chile y Brasil, se ha determinado que los pacientes chagásicos crónicos desarrollan la patología en los órganos digestivos y/o en el corazón, a la vez se sabe que en estos países predomina el *T. cruzi II* [FREITAS, LAGES-SILVA, ET AL; 2005]. Por otra parte, en los países como Venezuela, Colombia y México, se observa una patología chagásica de tipo cardíaca exclusivamente, la cual es causada por el *T. cruzi I* [AÑEZ, et al, 2004; BOSSENO, et al, 2002; BUSCAGLIA, NOIA; 2003].

En vista de que los diferentes clones de *T. cruzi* se presentan en diferentes tejidos, también es importante tener en cuenta que éstos pueden llegar a coexistir en distintos órganos de un mismo paciente. Este caso fue estudiado en detalle por un grupo de investigación de la Universidad Federal de Minas Gerais en Brasil. Se utilizó la técnica LSSP-PCR (Low Stringency Single Primer-Polymerase Chain Reaction) para obtener los perfiles genéticos característicos de cada clon de una misma cepa de *T. cruzi* encontrada en los tejidos afectados de varios pacientes. Se estudiaron las muestras de tejido cardíaco de 13 pacientes con cardiomiopatía chagásica y de 4 pacientes con megaesófago, de los cuales dos de ellos también presentaban cardiomiopatía. El hallazgo más significativo de este estudio fue que los pacientes que presentaban ambos tipos de patología chagásica (digestiva y cardíaca) presentaban diferentes perfiles genéticos del parásito en cada uno de los tejidos. De esta manera se comprobó que en un mismo individuo pueden haber diferentes clones de *T. cruzi* afectando a su vez diferentes órganos. [VAGO, ANDRADE, et al; 2000]. Posteriormente este hallazgo fue reproducido experimentalmente en ratones, confirmándose de esta manera la distribución de diferentes clones del parásito en diferentes tejidos, con lo que también se comprobó que la variabilidad genética del *T. cruzi* es un factor determinante en el desarrollo de la patología de la enfermedad de Chagas [ANDRADE, MACHADO, et al; 2002].

3.2.5 kDNA del *Trypanosoma cruzi*

El kinetoplasto o kDNA es una estructura especializada de los tripanosomas, siendo esta una red de ADN extranuclear. El genoma del *T. cruzi* ha sido publicado incluído el kDNA. Este constituye una red que representa entre el 10-15% del ADN total de la célula. El kDNA está estructurado por la concatenación de dos tipos de moléculas circulares de ADN: los minicírculos y los maxicírculos. Los primeros poseen una longitud entre 100-2500 bp. Actualmente se sabe que su función consiste en codificar pequeños ARN's que dirigen el procesamiento (por edición) de mtRNA's, siendo estos últimos codificados por los genes de los maxicírculos. Al llevar a cabo esta función, los minicírculos realizan una contribución importante al enorme contenido y heterogeneidad en el componente de mtDNA de estos parásitos [MACHADO, PINTO, et al; 2006]. Cabe resaltar que la organización de los minicírculos en el *T. cruzi* está altamente conservada en ambos linajes, siendo así que ambos poseen moléculas que tienen igual número de y longitud de regiones conservadas y variables [JUNQUEIRA, DEGRAVE, BRANDAO; 2005].

Por otra parte, los maxicírculos son moléculas mayores de ADN, que contienen una longitud entre 30000-50000 bp. Se encuentran en mucho menor número que los minicírculos (unas pocas docenas por célula) y contienen los genes que codifican los rRNA's, entre otros genes que codifican subunidades de las enzimas implicadas en el proceso de respiración, tales como las subunidades II y III (COII y COIII) de la enzima citocromo-c-oxidasa, la subunidad 7 (ND7) de la NADH deshidrogenasa y la subunidad 6 (A6) de la enzima ATPasa. Se han comparado las secuencias de los genes mitocondriales con los ARN's codificados por ellos y se encontró que no corresponden íntegramente, siendo así que los ARN's contenían residuos de uridina internos adicionales a los esperados por la secuencia génica que los codificó. Con menor frecuencia también se han encontrado residuos de uridina faltantes en el ARN. De esta forma, se descubrió uno de los fenómenos más interesantes de la biología de los tripanosomas: la edición post-transcripcional de sus RNA mensajeros mitocondriales. Dada la importancia de este proceso de edición, la posibilidad de inhibirlo puede llegar a ser una estrategia para detener el desarrollo del parásito [TELLERIA, LAFAV, VIRREIRA; 2006].

En un estudio reciente se investigaron los perfiles de transcripción diferencial en el *T. cruzi* asociados a las formas clínicas de la enfermedad de Chagas, y se encontró que el maxicírculo que codifica la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa (ND7) presenta una delección de 455 bp en las muestras de hemocultivo de pacientes asintomáticos. Esta lesión en la estructura del gen de ND7 da lugar a un mRNA truncado que a su vez puede alterar la función del complejo mitocondrial del parásito. Los autores de este estudio concluyeron que ND7 puede funcionar como marcador molecular de potencial interés para el diagnóstico de muestras aisladas de pacientes chagásicos, siendo así que aquellas muestras que presenten la delección en ND7 corresponden a la fase asintomática de la enfermedad [BAPTISTA, VÊNICIO, et al; 2006].

3.2.6 Tripanosomiasis americana en Colombia

En Colombia los vectores principales son el *R. prolixus* y el *T. dimidiata* [MONTILLA, GUHL, et al; 2002]. Los primeros informes científicos sobre animales domésticos y silvestres reservorios del *T. cruzi* fueron realizados por César Uribe Piedrahíta en 1929. Uribe encontró vectores del *T. cruzi* en Prado (Tolima), lo cual comunicó en su artículo “Infección de *Rhodnius prolixus* Stahl por *T. cruzi* y *T. rangeli*”, en la Revista Médico-Quirúrgica de los Hospitales de Bogotá, en dicho año. En 1947 J. Caicedo y C. Hernández escribieron su informe sobre los primeros casos crónicos de la enfermedad comprobados en Colombia, procedentes de Fusagasugá, Cundinamarca. En 1975, Cornelis Marinkelle, así como Antonio D'Alessandro y sus colaboradores de la Universidad del Valle, llevaron a cabo investigaciones, en los llanos orientales, publicadas en 1984. Los casos de enfermedad de Chagas descubiertos por el médico Carlos Duarte ocasionaron la venida (a la zona de las selvas del Putumayo) de los profesores Augustini y Franklin A. Nova, de la Escuela de Salud de Harvard, para realizar investigaciones sobre tripanosomas en el Catatumbo y, luego, en la Amazonía.

En la década de los noventa en Bucaramanga en la Universidad Industrial de Santander, se creó el Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) que ha servido de apoyo a la investigación y control de la enfermedad de Chagas [SERPA, 2003].

También cabe mencionar el Grupo de Investigación sobre la enfermedad de Chagas de la Universidad de Antioquia. Sus proyectos se centran en el estudio de la estructura

genética y las relaciones filogenéticas existentes entre diversas cepas colombianas de *T. cruzi*, mediante la técnica de análisis por marcadores de isoenzimas y esquizodemas [JARAMILLO, MORENO, et al; 1999]. Posteriormente investigaron, mediante el uso de la técnica de LSSP-PCR en una región variable de los minicírculos del kDNA, con el fin de determinar una posible relación genética entre las diversas cepas de *T. cruzi* aisladas de las diferentes especies de vectores y hospederos humanos. En este estudio encontraron gran similitud en una misma región variable de los minicírculos entre las diferentes cepas encontradas en los pacientes de una misma región geográfica [SALAZAR, SCHIJMAN, et al; 2006].

Finalmente, es importante hacer mención del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, el cual realiza investigaciones en el hospedero humano con el fin de determinar marcadores de susceptibilidad y/o severidad a la enfermedad de Chagas, entre otros proyectos relacionados con enfermedades infecciosas y autoinmunes. El GIEM se centra en la identificación de genes implicados en los mecanismos de defensa que pueden estar involucrados en la susceptibilidad genética de los individuos a desarrollar enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. Estas investigaciones aprovechan la información disponible del Proyecto Genoma Humano [DIVISIÓN DE PUBLICACIONES UIS, 2005].

3.3 HIPÓTESIS DE LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.3.1 Hipótesis de la autoinmunidad

Esta hipótesis surgió del hallazgo, en el suero de los pacientes, de anticuerpos que reconocen antígenos tanto del parásito como del tejido cardíaco del hospedero; a la vez que esto sucedía en una escasez de carga parasitaria en los tejidos dañados del paciente crónico [KALIL, CUNH-NETO; 1996]. A pesar de este descubrimiento, aún no está claro si el mecanismo de autoinmunidad es una causa de la patología de la enfermedad de Chagas o si es una consecuencia de la misma [KIERSZENBAUM, 2005].

Hay varios mecanismos que inducen la autoinmunidad, en el caso de la enfermedad de Chagas se cree que la autoinmunidad puede ser originada por cualquiera de los siguientes dos:

- 1) *Mímica molecular*: Se ha reportado que los linfocitos T aislados de sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos son reactivos a algunas secuencias de aminoácidos de la proteína B13 del *T. cruzi* y a otras secuencias correspondientes a la miosina cardíaca humana [IWAI, JULIANO, et al; 2005].
- 2) *Activación directa*: Puede ocurrir en un ambiente que favorece la inflamación de los tejidos inducida por la invasión del *T. cruzi*. Este ambiente rico en citoquinas y óxido nítrico puede ser suficiente para estimular los linfocitos T autorreactivos. Otro factor que puede contribuir a esto es la citólisis miocárdica resultante de la liberación de tripomastigotes al torrente sanguíneo, lo que a su vez puede liberar sustancias propias de las células cardíacas del organismo que pueden ser reconocidas como antígenos. En apoyo a esta teoría, se han reportado varios ejemplos de autoinmunidad que ocurre luego del daño generado por una cirugía del corazón, el rechazo de trasplantes y otras infecciones al corazón causadas por virus [ENGMAN, LEON; 2002].

Sin embargo esta hipótesis presenta dos principales contradicciones. La primera consiste en que también se han encontrado los linfocitos T autorreactivos en la sangre periférica de pacientes asintomáticos; por lo que se puede deducir que éstos no serían los responsables directos del daño en los tejidos de los pacientes sintomáticos

[HYLAND, ENGMAN; 2006]. La otra contradicción consiste en que la aplicación de un tratamiento inmunosupresivo aliviaría los síntomas causados por una enfermedad autoinmune, pero ya se ha constatado que esto es contraproducente en el caso de la enfermedad de Chagas [TARLETON, 2001].

3.3.2 Hipótesis de la persistencia del parásito

Esta hipótesis se apoya en el hecho de que los tratamientos dirigidos a la disminución de la carga parasitaria conducen a una mejoría de los síntomas en los pacientes chagásicos crónicos. Se ha reportado que el suministro del fármaco benznidazole a largo plazo condujo a la mejoría del 8% de los pacientes crónicos tratados [CANCADO, 2002].

Otro aspecto a favor de esta hipótesis es el hecho de que se detecta ADN y proteínas de los amastigotes en los tejidos dañados únicamente. Es decir, que en los pacientes que desarrollan cardiomiopatía, se encuentran dichos componentes del parásito solamente en el tejido cardíaco afectado; y a su vez los pacientes que desarrollan megaesófago o megacolon contienen los mismos componentes del parásito en dichos tejidos afectados [TARLETON, 2003].

Otro aspecto que conllevaría a la aceptación de esta teoría sería el desarrollo de una vacuna que indujera la disminución de carga parasitaria de *T. cruzi* en los pacientes chagásicos. Se sabe que el desarrollo de vacunas es el tratamiento médico más eficaz en el control de enfermedades infecciosas. Aunque no se ha desarrollado una vacuna viable para la enfermedad de Chagas, ya se han identificado varios antígenos con un uso potencial en inmunoterapia. Los genes que codifican dichos antígenos podrían ser utilizados para desarrollar una vacuna de ADN, en vista de que ha sido demostrado recientemente que las vacunas de ADN pueden inducir una respuesta de linfocitos T [LIU, 2003]. Se ha comprobado experimentalmente en ratones la eficacia de plásmidos que contienen el gen PFR2 para inducir los anticuerpos adecuados en contra del *T. cruzi*. Posteriores estudios irían dirigidos en la implementación de dichos plásmidos en el diseño de una vacuna para humanos [MORELL, THOMAS, et al; 2006].

3.3.3 Hipótesis de la genética del parásito y/o del hospedero

Con el desarrollo de la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) se hizo posible la detección de genes del parásito en la sangre periférica y en los tejidos de los hospederos mamíferos infectados [GOMES, et al, 1998; JONES, et al, 1993]. Estos nuevos estudios dieron lugar a establecer la noción de que la variación genómica del *T. cruzi* puede influenciar el curso de la enfermedad [MACEDO, MACHADO, et al; 2004].

Por otra parte la genética del hospedero puede ser el punto central para explicar porqué sólo el 30% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrolla la patología de la enfermedad. En una investigación llevada a cabo con ratones y cerdos se determinó si la infectividad de una cepa de *T. cruzi* podía ser modificada cuando se somete a varios hospederos. Los resultados demostraron que luego de mantener el parásito en dos hospederos diferentes, esto conllevó a una alteración en su infectividad (de acuerdo con las pruebas parasitológicas), mas no en su perfil genético según el análisis por RAPD. Este incremento en la infectividad se observó en los clones que pasaron por los ratones, mientras que aquéllos que pasaron por los cerdos no manifestaron ningún cambio. Este es un fenómeno que demuestra ser dependiente del hospedero, ya que el comportamiento de una misma cepa del parásito fue diferente en ambos hospederos. Características del hospedero, tales como la respuesta inmune probablemente influenciaron los cambios observados en la infectividad del parásito. Por lo tanto estos resultados sugieren una fuerte influencia de los factores genéticos del hospedero en el comportamiento de las cepas de *T. cruzi*. [PEREZ, PADILLA, et al; 2006].

3.3.4 Hipótesis de la inserción de kDNA del *Trypanosoma cruzi* al hospedero

Teixeira y colaboradores han postulado que el kDNA presenta la facultad de transferirse al genoma de las células afectadas del hospedero [TEIXEIRA, ARGANÑARAZ et al; 1994]. Se han realizado varios estudios interesantes acerca de la transponibilidad del kDNA en los genomas de pacientes chagásicos crónicos en la Facultad de Medicina de la Universidad de Brasilia. En uno de estos estudios, hicieron una comparación de la inserción del kDNA en el genoma presente en muestras de sangre de 13 pacientes chagásicos crónicos (todos estos pacientes habían portado el parásito por más de 30

años) para determinar si realmente existía transferencia genética horizontal de ADN del *T. cruzi* hacia organismos de diferente reino.

Los resultados del análisis revelaron la presencia de fragmentos de minicírculos de kDNA insertados covalentemente en el genoma de cada uno de los 13 pacientes en uno o más loci. Se identificaron cinco loci que servían como sitios de inserción, además del locus β -globina en el cromosoma 11 en 9 de los 13 pacientes y los retroposones LINE-1, los cuales también sirvieron, frecuentemente, como blanco de inserción. Se encontró que los elementos repetitivos cortos del parásito, en conjunto con los del hospedero, facilitaban la inserción del kDNA mediante recombinación homóloga.

Además de comprobar la transferencia genética del *T. cruzi* hacia humanos, se reprodujo experimentalmente esta transferencia en conejos y pollos. El kDNA estuvo presente en los genomas de ocho conejos infectados crónicamente (entre 6 meses y 3 años). El DNA fue extraído de muestras de tejido cardíaco, muscular, intestinal, hepático, renal y sanguíneo; los cuales fueron hibridados con una región de 122 bp del minicírculo del kDNA. En los pollos se observó una línea germinal que heredó el kDNA insertado en el genoma de los progenitores, en total ausencia de infección persistente. Los autores de este estudio llegaron a la conclusión de que quizás el problema más importante en el campo de la investigación de la enfermedad de Chagas sea la determinación de la patogénesis durante la fase crónica. A partir de esta idea, ellos proponen la posibilidad de que la inserción del kDNA induzca una mutación génica, la cual sería causante de la producción de proteínas quiméricas, que a su vez serían las responsables directas de la respuesta autoinmune [NITZ, GOMES, et al; 2004].

Posteriormente estos mismos investigadores postularon en otro estudio que dicha inserción podía mobilizarse a través del genoma del hospedero. Para ello cultivaron una línea de macrófagos humanos que fueron infectados con *T. cruzi* y se observó que las células infectadas recientemente (a los siete días de infección) presentaban bandas de 1200, 1800 y 2200 bp; además de la banda de 360 bp del kDNA del *T. cruzi*. Por otra parte, en las células que tenían 30 días de haber sido infectadas, no se encontró la banda de 360 bp; pero las demás bandas sí, y en mayor intensidad, es decir en mayor cantidad. Luego se tomaron algunas de estas últimas muestras para clonarlas y secuenciarlas y se

encontró que contenían la secuencia correspondiente a una región de uno de los minicírculos del kDNA del *T. cruzi*: la secuencia S36. Se utilizó también la técnica de Southern blot para analizar dichas muestras y se observó que los fragmentos de las mismas hibridaban con la sonda L1 (una secuencia de oligonucleótidos correspondiente al retroposón LINE-1 del genoma humano), por lo tanto se verificó que la secuencia S36 se había insertado en el retroposón LINE-1 del ADN de los macrófagos y que de esta manera se podía seguir movilizando a través del genoma humano gracias a la movilización del elemento LINE-1 [SIMOES-BARBOSA, ARGANÁRAZ, et al; 2006].

El estudio realizado en el presente proyecto se basó precisamente en comprobar si esta hipótesis propuesta por Teixeira y colaboradores de la Universidad de Brasilia se presenta en el caso del *Trypanosoma cruzi I*, principal causante de la enfermedad de Chagas en la región de Santander, Colombia.

3.4 TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

3.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de una cantidad mínima del mismo. Es así como esta técnica permite que cualquier muestra de ADN pueda ser amplificada hasta en un millón de veces su cantidad original. La amplificación de un segmento de ADN por PCR comprende los siguientes pasos:

1. *Desnaturalización*: Las cadenas de ADN son separadas por calentamiento a 95°C.
2. *Hibridación*: Al bajar la temperatura hasta llegar al rango que está entre 50-65°C, los cebadores se hibridarán con su secuencia complementaria en el ADN molde desnaturalizado en el paso anterior. Estos cebadores actúan como límites de la región de la molécula de ADN que va a ser amplificada.
3. *Extensión*: La reacción de replicación o síntesis de ADN es catalizada por la enzima *Taq* polimerasa, la cual toma el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria, partiendo del cebador como soporte inicial y posteriormente añadiendo los dNTP's presentes en el medio de reacción. La temperatura de máxima actividad para la *Taq* polimerasa está entre 75-80°C. El tiempo de extensión depende de la enzima usada, así como de la longitud del fragmento de ADN que se quiere amplificar.
4. Se repiten los tres primeros pasos para 25-30 ciclos. Luego de esto, el fragmento original de la muestra de ADN ha sido amplificado aproximadamente en 10^6 veces.

La realización del análisis de una muestra de ADN mediante la técnica de la PCR requiere de la preparación de los siguientes componentes:

1. *Solución tampón de amplificación*: Los tampones de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y $MgCl_2$. El $MgCl_2$ es el que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción, ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para

la actividad de la enzima *Taq* polimerasa, actuando como cofactores de ésta. La concentración óptima de $MgCl_2$ está en torno a 1.5mM, si se emplean concentraciones de 200mM de cada uno de los dNTP's. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg, puesto que un exceso del mismo conlleva a la acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

2.*Cebadores*: La longitud de cada uno de los iniciadores debe estar entre 18-24 pares de bases, pues se ha comprobado que los iniciadores de mayor longitud no aumentan el rendimiento, y los de menor longitud carecen de suficiente especificidad. Ambos cebadores deben tener una temperatura de fusión similar (máximo 5°C de diferencia). La relación bases purínicas: bases pirimidínicas debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%). La secuencia de los iniciadores debe comenzar y terminar con dos bases purínicas. Para evitar la formación de dímeros de iniciadores es necesario comprobar que éstos no contengan secuencias complementarias entre sí.

3.*Desoxirribonucleótidos trifosfatos*: Las concentraciones de los dNTP's que suelen usarse están en torno a 200µM para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de 25µl con esta concentración de dNTP's se sintetizarían entre 6-6.5µg de ADN. La concentración de dNTP's y de $MgCl_2$ van relacionadas ya que el Mg se enlaza a los dNTP's, con lo que las concentraciones elevadas de los mismos inhibirían la reacción al no tener la *Taq* polimerasa suficiente Mg para la incorporación de los dNTP's. Para una concentración de 200µM de cada dNTP se suele añadir $MgCl_2$ a una concentración de 1.5mM.

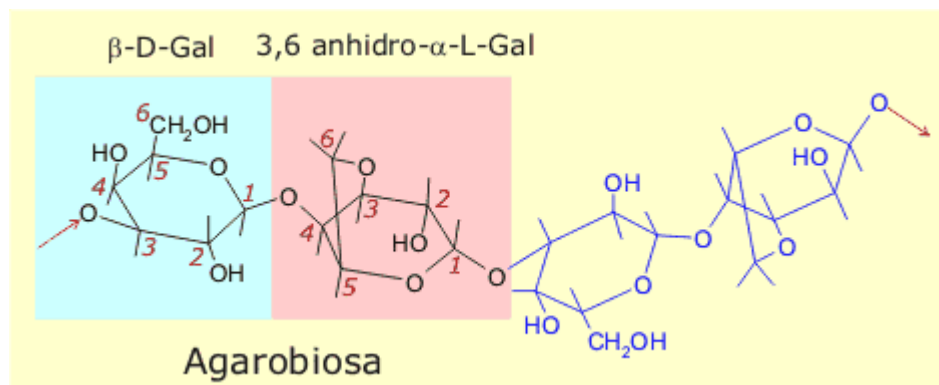
4.*Taq polimerasa*: Las cantidades óptimas de *Taq* polimerasa para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades de la enzima en 25µl de volumen final de reacción. La actividad de esta enzima está influenciada por la concentración de dNTP's, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes, de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. Por otra parte, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la enzima en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50mM.

5. *ADN molde*: Es la muestra de ADN que se quiere amplificar, cabe resaltar que la cantidad de ADN de la muestra no debe ser menor a los 5ng [MULLIS, 1987].

3.4.2 Electroforesis en gel de agarosa

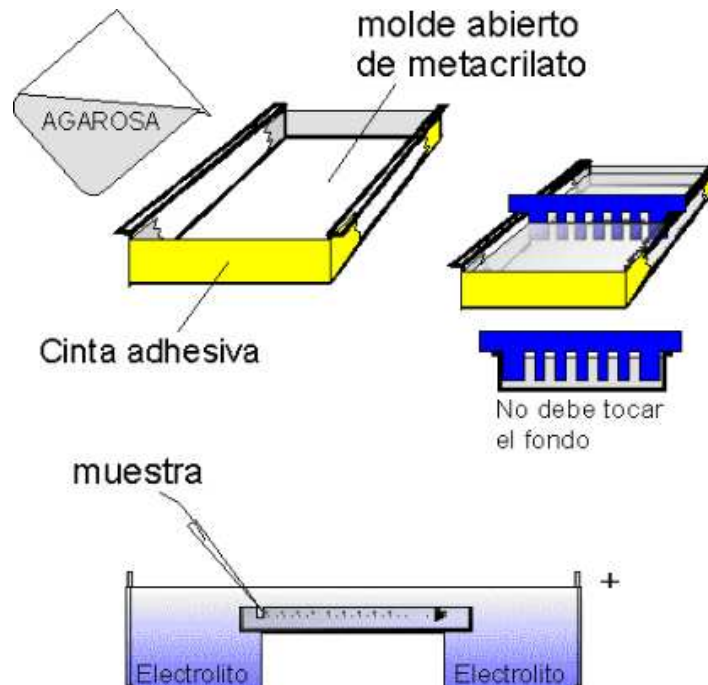
Para visualizar las bandas de ADN contenidas en una muestra es necesario sembrarlas en un gel de agarosa y separarlas mediante la aplicación de un voltaje en la solución salina en la que se encuentra sumergido el gel con las muestras sembradas. Los fragmentos de ADN son así separados según su tamaño, puesto que los fragmentos más livianos migran más rápido que los más pesados. Toda muestra de ADN proveniente de una PCR o de una digestión con enzimas de restricción es analizada mediante esta técnica. Cada muestra de ADN es mezclada con una solución tampón de carga, la cual está compuesta por un polisacárido de alta densidad denominado ficol y una mezcla de tres colorantes (azul de bromofenol, naranja G y xilenocianol) que permite visualizar el avance de las muestras durante el transcurso de la electroforesis. El gel es teñido con bromuro de etidio, que es la sustancia que al ser iluminada con radiación ultravioleta fluoresce y permite ver las bandas de ADN, cualquier banda que contenga una cantidad igual o mayor a 20ng de ADN se hace claramente visible gracias a este compuesto fluorescente. La siguiente figura muestra la estructura química de la agarosa:

Figura 3. Estructura química del dímero constituyente de la agarosa. Tomado de [http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.uchile.cl/AlasbimnImages/mn-2000-20\(2\)-kessi-fig005.jpg](http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.uchile.cl/AlasbimnImages/mn-2000-20(2)-kessi-fig005.jpg)



La separación de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa permite determinar su peso en términos del número de pares de bases. Junto con las muestras se siembra un marcador de peso molecular, disponible comercialmente, que consta de una mezcla de fragmentos de ADN cuyo número de pares de bases es conocido y de esta manera se puede visualizar el tamaño de las bandas de ADN presentes en las muestras bajo estudio [LEHNINGER, 2000]. El proceso completo se resume en la siguiente figura:

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa. Tomado de [http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.uchile.cl/AlasbimnImages/mn-2000-20\(2\)-kessi-fig006.jpg](http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.uchile.cl/AlasbimnImages/mn-2000-20(2)-kessi-fig006.jpg)



3.4.3 Hibridación con sondas

Esta técnica conocida comúnmente como Southern blot, en honor a su inventor el biólogo británico Edwin Southern, es un método utilizado rutinariamente en biología molecular para detectar la presencia de una secuencia específica de ADN en una muestra cualquiera de ADN. Las etapas que constituyen esta técnica se numeran a continuación:

1. *Digestión del ADN genómico con enzimas endonucleasas de restricción:* Estas enzimas reconocen una secuencia específica del ADN y además lo cortan en ese mismo punto o en otro cercano a éste, rompiendo los dos enlaces fosfodiéster de la doble hélice y generándose así fragmentos de diferentes tamaños. Las enzimas utilizadas en este estudio fueron la *EcoRI* y la *BamHI*, sus principales características se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Características de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Tomado de http://es.wikipedia.org/wiki/Enzima_de_restricci%C3%B3n

Enzima	Origen bacteriano	Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'

Esta técnica requiere una gran cantidad de material genético, es decir se necesita que la muestra de ADN tenga una concentración igual o mayor a 100ng/μl. En el caso de una doble digestión (una digestión con dos enzimas diferentes de restricción) se necesita que dicha concentración sea por lo menos de 300ng/μl [LEHNINGER, 2000].

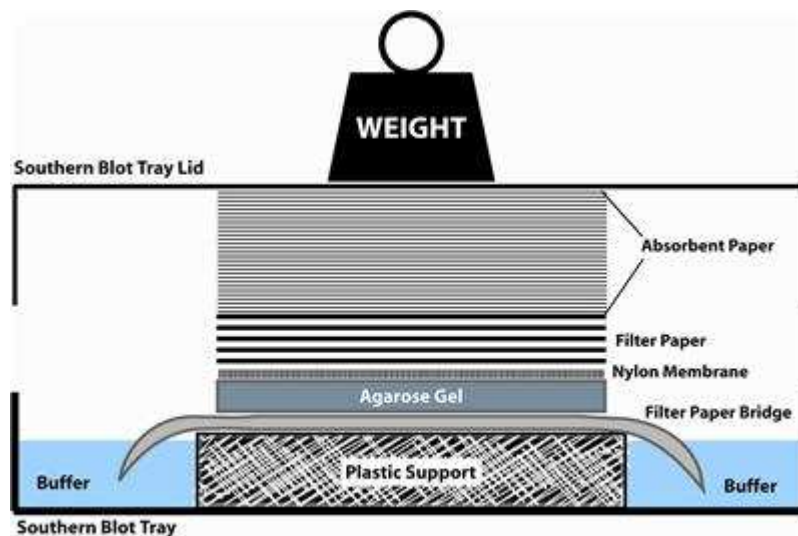
2. *Separación de los fragmentos obtenidos:* Esto se hace por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

3. *Desnaturalización de los fragmentos separados:* Se coloca el gel de agarosa en una solución que contiene hidróxido de sodio, con el fin de desnaturalizar la doble hélice de las muestras de ADN en el gel. Esto ayuda a que el ADN de carga neta negativa, se enlace más fácilmente a una membrana de nylon cargada positivamente, además de que las muestras de ADN quedan en forma de cadena sencilla para hibridarse luego

con la sonda, y por último se destruye cualquier residuo de ARN que haya en las muestras de ADN [LEHNINGER, 2000].

4. *Transferencia de las cadenas simples a una membrana de nylon:* Se coloca el gel encima de un papel filtro de igual tamaño y que esté en contacto con una solución tampón de citrato trisódico, encima del gel se coloca una membrana y sobre ésta se coloca una pila de toallas absorbentes. Finalmente se coloca un peso de alrededor de medio kilo sobre las toallas, lo cual garantiza la transferencia de la muestras de ADN desde el gel hacia la membrana por acción capilar [LEHNINGER, 2000]. A continuación se ilustra un esquema del montaje de transferencia:

Figura 5. Montaje de transferencia de ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nylon. Tomado de <http://www.mmi.mcgill.ca/mmimediassampler2002/images/5no15/5no15overview.gif>



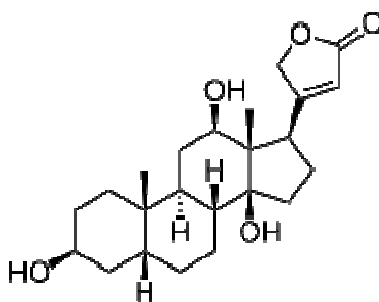
5. *Fijación de las muestras de ADN en la membrana de nylon:* Para esto se puede calentar la membrana a 80°C o se puede irradiar con luz ultravioleta, con el fin de enlazar el ADN de manera covalente a la membrana de nylon [LEHNINGER, 2000].

6. *Hibridación de las muestras de la membrana de nylon con una sonda:* La sonda es un fragmento sencillo de ADN con una secuencia específica cuya presencia está por determinarse en las muestras de ADN de la membrana. Esta sonda debe estar marcada

para ser detectada, usualmente mediante la incorporación de elementos radiactivos (por ejemplo ^{32}P) o enlazando a la sonda una molécula con un agente fluorescente o cromogénico. Para asegurar la especificidad de la hibridación de la sonda con el ADN de la membrana se utiliza ADN de esperma de salmón para el bloqueo de la superficie de la membrana, además de formamida desionizada y detergentes tales como el SDS para reducir hibridaciones no específicas de la sonda.

En este estudio se utilizó el marcaje enzimático aleatorio de la sonda con digoxigenina. La digoxigenina es un esteroide exclusivo de las flores y hojas de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Es una molécula que posee propiedades inmunogénicas, siendo por ello aplicada en varias técnicas de biología molecular. Los anticuerpos generados en contra de los haptenos como la digoxigenina tienen una mayor especificidad por sus antagonistas que otros anticuerpos. Es por esta razón que la digoxigenina se convierte en un marcador inmunohistoquímico estándar para realizar hibridaciones in situ. A continuación se ilustra la estructura química de la digoxigenina:

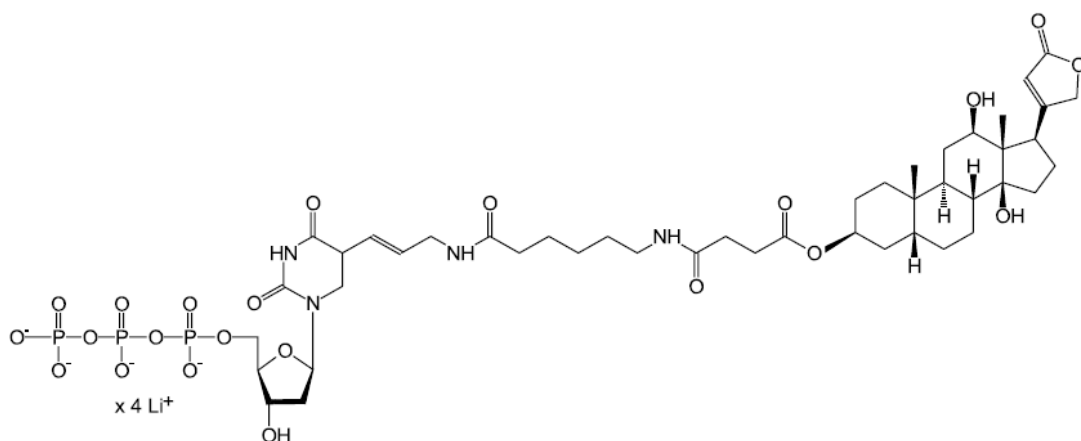
Figura 6. Estructura química de la digoxigenina. Tomado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Digoxigenin>



La mezcla de marcaje enzimático aleatorio de la sonda con digoxigenina incluye la enzima Klenow polimerasa, cebadores hexámeros, dNTP's, DIG-dUTP, además de otros componentes de la solución tampón que requiere la enzima. Al adicionar a esta mezcla el ADN que se quiere marcar, la enzima Klenow polimerasa va incorporando un DIG-dUTP cada 20-25 pares de bases, razón por la cual se obtiene una sonda altamente sensible, capaz de detectar su secuencia homóloga en una muestra de ADN de la membrana de nylon cuya cantidad puede ser de apenas 0,1pg [DIG APPLICATION

MANUAL, 2000]. En la siguiente figura se muestra la estructura química del DIG-dUTP:

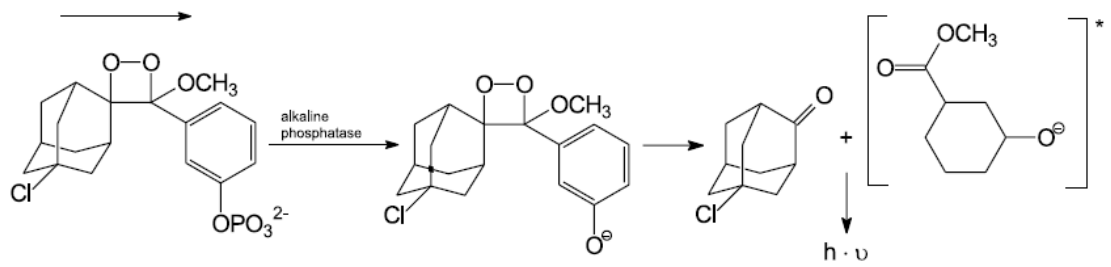
Figura 7. Estructura química del DIG-dUTP. Tomado de DIG Application Manual de Roche Diagnostics.



7.Detección de la hibridación: Después de la hibridación se lava el exceso de sonda de la membrana, se bloquea con una solución específica para ello y se lava con una solución que contenga el respectivo anticuerpo (conjugado con alcalina fosfatasa) del agente fluorescente contenido en la sonda marcada con dicho agente. A continuación se agrega un sustrato que genere la reacción de quimioluminiscencia y el patrón de hibridación es visualizado en una película de rayos X mediante una autorradiografía.

El anticuerpo de antidigoxigenina utilizado se encuentra a su vez conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, la cual reacciona posteriormente al agregarse la solución de CSPD (1,2-dioxetano fosfato adamantil 5-cloro sustituido). Esta reacción quimioluminiscente consiste en la desfosforilación enzimática del sustrato CSPD mediante la acción de la enzima fosfatasa alcalina, generándose así una emisión de luz cuya máxima longitud de onda es de 477nm. Esta emisión de luz no es detectable a simple vista, siendo por ello necesaria la exposición a una película de rayos X durante un intervalo de tiempo adecuado, determinado experimentalmente según la calidad de la película utilizada [DIG APPLICATION MANUAL, 2000]. En la siguiente figura se muestra el esquema de esta reacción:

Figura 8. Reacción quimioluminiscente del CSPD. Tomado de DIG Application Manual de Roche Diagnostics.



4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 MUESTRAS DE ESTUDIO

Las muestras de ADN analizadas, forman parte de un estudio realizado por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) con 260 individuos seropositivos a antígenos de *Trypanosoma cruzi*, con el fin de analizar por SSP y RFLP-PCR polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes, tanto de proteínas relacionadas con actividad pro-inflamatoria (TNF- α , IL-1, IL-12 y CCR5), como anti-inflamatoria (IL-10 e IL-1Ra), al igual que receptores de inmunidad innata como TLR2 [ZAFRA, FLÓREZ, et al; 2006]. Estas muestras fueron extraídas de sangre periférica de los pacientes seropositivos a antígenos del *T. cruzi*, mediante la extracción de ADN utilizando el protocolo denominado Salting out. Para la realización del presente proyecto se tuvieron en cuenta 130 muestras correspondientes a pacientes chagásicos sintomáticos (los cuales presentan diferentes grados de cardiomiopatía) y 50 muestras provenientes de pacientes chagásicos asintomáticos.

4.2 AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se hicieron PCR's para determinar la presencia de ADN del parásito, con secuencias propias del mismo, más concretamente con los pares de cebadores de secuencias específicas del kDNA S35/S36 y nDNA Tcz1/Tcz2 del *Trypanosoma cruzi*. Ambas PCR se realizaron de acuerdo con los parámetros de estandarización determinados en el laboratorio del grupo. Para cada PCR se utilizaron controles negativos y positivos.

4.2.1 PCR con los cebadores Tcz1 y Tcz2

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20 μ l, conteniendo agua destilada estéril, solución tampón 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, 200 μ M de dNTP's, 0,5 mM de cada cebador Tcz1: 5'-CGAGTCCTTGCCCACACACGGG-3' y Tcz2: 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTC-3', 0,6 U/ μ l de enzima Tucan Taq DNA Polimerasa y 1 μ l de la muestra de ADN. Las cantidades utilizadas de cada componente de la PCR se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 2. Preparación de la mezcla de PCR con los cebadores Tcz1 y Tcz2.

Reactivo	Volumen en el vial de PCR (μl)	Concentración final (vial de PCR)
Agua destilada	13,28	---
Solución tampón (10X)	2	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2	1,5mM
dNTP's (10 mM)	0,4	200 μ M
Cebador Tcz1 (10 μ M)	1	0,5 μ M
Cebador Tcz2 (10 μ M)	1	0,5 μ M
Tucan Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l)	0,12	0,6 U/ μ l
DNA (de cada muestra)	1	---

Cada muestra con su mezcla de PCR se sirvió en un vial de 0,2ml. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PERKIN ELMER 2400 Bio-Rad, Inc., de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, correspondientes a los tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. Posteriormente se sometió por 7 minutos a 72°C, para la extensión final [MOSER, KIRCHOFF, DONELSON; 1989].

Figura 9. Vista de la muestras en el termociclador.



4.2.2 PCR con los cebadores S35 y S36

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20 μ l, conteniendo agua destilada estéril, solución tampón 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, 200 μ M de dNTP's, 0,6 mM de cada cebador, S35: 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3', y S36: 5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3', 0,6 U/ μ l de enzima Tucan Taq DNA Polimerasa y 1 μ l de la muestra de ADN. Las cantidades utilizadas de cada componente de la PCR se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 3. Preparación de la mezcla de PCR con los cebadores S35 y S36.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final (vial de PCR)
Agua destilada	12,88	---
Solución tampón (10X)	2	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	1,5mM
dNTP's (10 mM)	0,4	200 μ M
Cebador S35 (10 μ M)	1,2	0,6 μ M
Cebador S36 (10 μ M)	1,2	0,6 μ M
Tucan Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l)	0,12	0,6 U
DNA (de cada muestra)	1	---

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador PERKIN ELMER 2400 Bio-Rad, Inc., de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C y 2 minutos a 72°C, correspondientes a los tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. Finalmente se sometió por 10 minutos a 72°C, para la extensión final [AVILA, PEREIRA, et al; 1993].

4.2.3 Electroforesis de las muestras de ADN amplificadas por PCR

El corrimiento del producto de cada PCR se realizó en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Los pasos de ejecución fueron los siguientes:

- 1.Preparación del Buffer TAE 1X:* A partir de la solución TAE 50X (Tris-base, Ácido acético y EDTA) se preparó una dilución a solución tampón TAE 1X.
- 2.Preparación del gel de agarosa:* Para el molde de la cámara electroforética (Bca Radd- Wide Mini subcell GT) se disolvieron 0,8g de agarosa en 45ml de buffer TAE 1X, a una temperatura de 97°C hasta observar el líquido perfectamente claro. Luego se agregó 1 μ l de bromuro de etidio y se sirvió en el molde, dejándolo solidificar por espacio de 20 minutos.

3. *Corrimiento*: En la cámara electroforética se introdujo el gel de agarosa, sumergiéndolo en solución tampón TAE 1X. Luego, se adicionó 5µl de solución tampón de carga en cada muestra y se sembraron en cada uno de los pozos del gel. Para cada electroforesis se cargaron 3,5µl del marcador de peso molecular de 50bp en un pozo de cada hilera de pozos. El corrimiento de los productos de PCR se hizo con un voltaje de 70V por un tiempo de 50 minutos.
4. *Observación de los geles*: los geles fueron observados bajo luz ultravioleta en el transluminador (Power-Pac 300) y fotografiados con una cámara digital (Canon) [RANGEL, 2002].

Figura 10. Vista del sembrado de las muestras en el gel de agarosa.

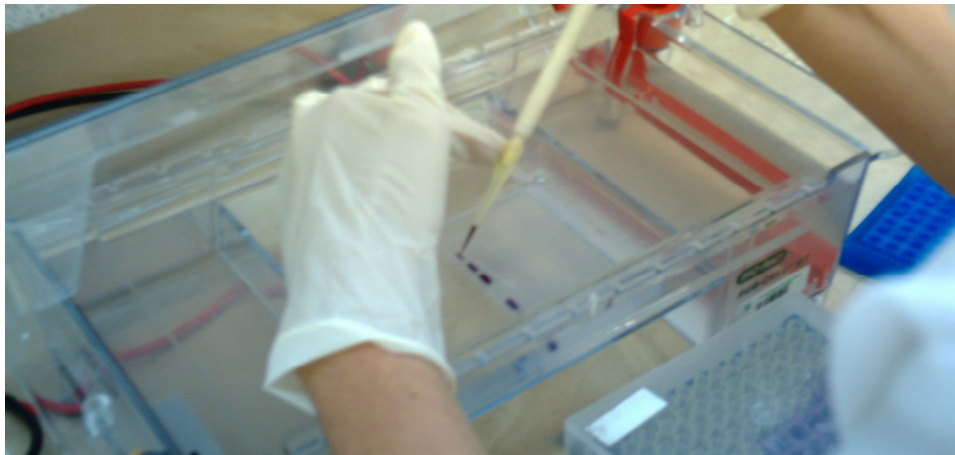
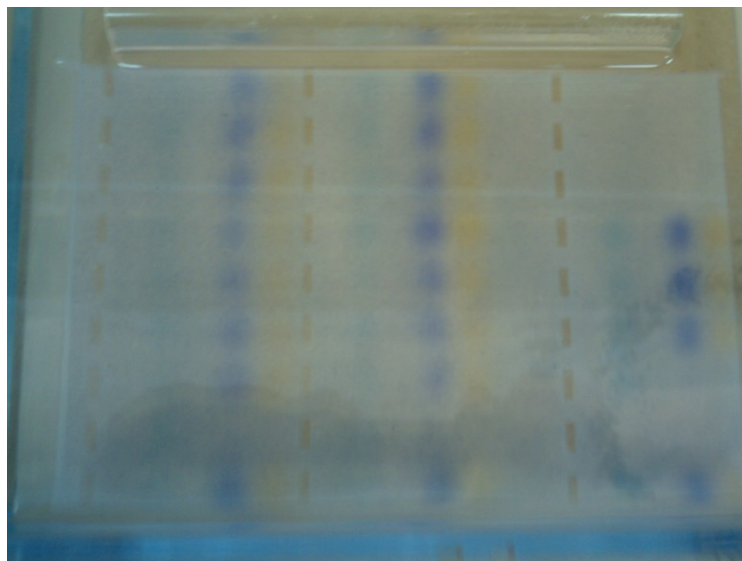


Figura 11. Vista del gel de agarosa al finalizar la electroforesis.



Al observar la separación de los tres colorantes que conforman la solución tampón de carga para cada muestra, es decir la separación del naranja G, xilenocianol y azul de bromofenol, se sabe que el gel ya está listo para ser observado en el transluminador y fotografiado.

4.3 DOBLE DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *BamHI* Y *EcoRI*

La PCR no provee resultados sobre la inserción del kDNA del parásito sino sólo de su presencia en las muestras, por ello fue necesario realizar la transferencia de las muestras de ADN desde un gel de agarosa a una membrana de nylon. Para este fin se utilizó ADN digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, este ADN luego fue separado en un gel de agarosa al 0,7% y transferido a una membrana de nylon para posteriormente realizar la hibridación de dichas muestras de la membrana con un oligonucleótido marcado enzimáticamente con digoxigenina. Al realizar este procedimiento con el ADN del paciente (fragmentado en secuencias especificadas por las enzimas utilizadas en la digestión) y con una secuencia específica de un gen del parásito como sonda, es posible determinar si existen fragmentos de dicho gen del parásito insertado en el genoma de los pacientes.

La doble digestión se llevó a cabo a un volumen final de reacción de 20 μ l, conteniendo agua destilada estéril, solución tampón Tango 1X, 0,7U/ μ l de enzima *BamHI*, 0,35U/ μ l de enzima *EcoRI*, y entre 1-5 μ g de ADN genómico. Las cantidades utilizadas de cada componente de la doble digestión se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 4. Preparación de la mezcla de doble digestión de ADN genómico.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ l)
Agua destilada	---	---	13
Solución tampón Tango	10X	2X	4
<i>BamHI</i>	10U/ μ l	0,7U/ μ l	1,4
<i>EcoRI</i>	10U/ μ l	0,35U/ μ l	0,7
DNA (de cada muestra)	1 μ g/ μ l	0,05 μ g/ μ l	1

La solución tampón Tango es una mezcla de Tris-acetato (33mM, pH 7,9), acetato de magnesio (10mM), acetato de potasio (66mM) y BSA (0,1mg/ml). Esta solución tampón es diseñada por el fabricante precisamente para garantizar un medio adecuado para cualquier par de enzimas endonucleasas durante una doble digestión de ADN genómico. Una vez preparada la mezcla, se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos en un horno de hibridación (Binder) [SANBROOK, RUSSELL; 2001].

4.4 TRANSFERENCIA CAPILAR DE LAS MUESTRAS DE ADN DESDE EL GEL DE AGAROSA A UNA MEMBRANA DE NYLON

Teniendo las muestras digeridas se procedió a sembrarlas en un gel de agarosa al 0,7% y se corrió la electroforesis a 55 voltios durante 2 horas. Luego, se observó el gel en el transluminador y se tomó la correspondiente fotografía junto a una regla fluorescente.

A continuación se preparó el gel para la transferencia. Para ello fue necesario sumergirlo en una solución desnaturalizante (NaOH 0,5M, NaCl 1M) durante 30 minutos, con agitación mecánica a 60 rpm en una incubadora-agitadora (Heidilph UNIMAX 1010). Después se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una solución neutralizante (NaCl 3M, Tris-HCl 1,5M, pH 7,5) nuevamente durante 30 minutos y con agitación mecánica a 60 rpm.

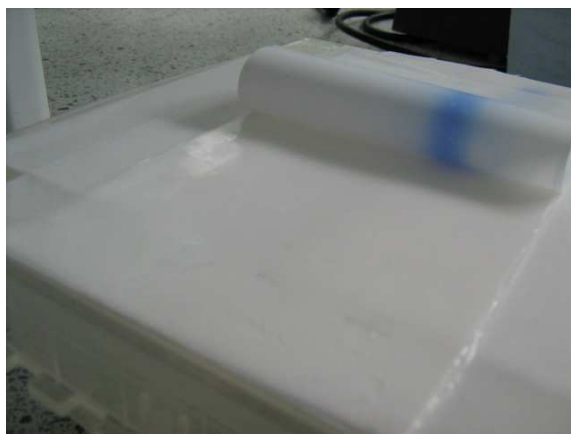
Una vez preparado el gel, se procedió a realizar el montaje de transferencia capilar. Primero se colocó un soporte de vidrio sobre un recipiente y se cubrió con una hoja larga de papel Whatman 3MM. El recipiente se llenó con solución tampón de transferencia SSC 10X (Citrato trisódico 0,3M, NaCl 3M). Encima de la hoja larga de papel Whatman se colocó otra hoja del mismo tamaño del gel y sobre ésta el gel. Luego se remojó la membrana de nylon (del mismo tamaño del gel) en solución de transferencia y se colocó sobre el gel, y se envolvieron sus bordes con papel Wrap de tal forma que quedaran a su vez sellados los bordes del recipiente expuestos a la atmósfera. Después se colocó encima de la membrana otra hoja de papel Whatman de igual tamaño. Finalmente se colocó una pila de toallas de papel, de tal manera que esta pila tuviera una altura de aproximadamente 8 cm, y encima se colocó un recipiente con 700 ml de agua. Una vez completado el montaje, se dejó que ocurriera la transferencia del ADN desde el gel a la membrana de nylon por acción capilar, durante 18 horas.

Figura 12. Vista lateral del montaje de transferencia de ADN.



Una vez completada la transferencia capilar de las muestras de ADN, se removió el peso, las toallas, el papel Whatman y se marcó con lápiz la ubicación de cada pozo del gel en la membrana para la correspondiente identificación de cada muestra de ADN. Posteriormente se remojó la membrana en solución SSC 2X, se colocó entre dos pedazos secos de papel Whatman, y se introdujo en un horno (Gemmy 888). Se calentó a 80°C durante 45 minutos [SANBROOK, RUSSELL; 2001].

Figura 13. Vista de la membrana luego de la transferencia capilar.



En esta fotografía se observa la membrana con una franja azul, lo cual indica que la solución tampón de carga que había en cada muestra de ADN del gel se transfirió al nylon. Paralelamente se observó el gel en el transluminador para constatar la ausencia de bandas de las muestras de ADN en el mismo.

4.5 MARCAJE DEL OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO kCR CON DIGOXIGENINA, HIBRIDACIÓN DEL MISMO CON LAS MUESTRAS DE ADN EN LAS MEMBRANAS DE NYLON Y DETECCIÓN DE DICHA HIBRIDACIÓN MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA

Se adquirió un oligonucleótido de 121bp sintetizado por Corpogen, cuya secuencia es: 5'-TTT GGT TTT GGG AGG GGC GTT CAA ATT TTG GCC CGA AAA TTC ATG CAT CTC CCC CGT ACA TTA TTT GGC CGA AAA TGG GGG TTG TTC GAT GGA GGT GAG GTT CGA TTG GGG TTG GTG TAA G. Esta secuencia, denominada kCR, es característica del kDNA de los tripanosomátidos [NITZ, 2004]. Para el proceso de marcaje, hibridación y detección de este oligonucleótido se dispuso del “DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit II” (Roche).

4.5.1 Marcaje enzimático aleatorio del oligonucleótido sintético kCR con digoxigenina

Se diluyeron 100 pmoles del oligonucleótido kCR en agua destilada estéril a un volumen final de 16 µl. Se adicionaron 4 µl de mezcla de marcaje con digoxigenina (DIG *high prime labeling mix*), se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se incubó a 37°C durante 5 horas, en el horno (Binder). Finalmente se detuvo la reacción calentando la solución a 65°C durante 10 minutos en un bloque seco (Lab-line Multi Blok Heater) [DIG APPLICATION MANUAL, 2000].

4.5.2 Hibridación de la sonda DIG-kCR con las muestras de ADN en las membranas de nylon

El proceso de hibridación se subdivide a su vez en las siguientes etapas y condiciones establecidas en el protocolo del fabricante del kit de marcaje y detección:

a) Prehibridación:

1. Se preparó la solución de DIG Easy Hyb del kit de Roche, disolviendo el contenido de una botella de gránulos DIG Easy Hyb en 100 ml de agua destilada.

2. Se precalentó un volumen adecuado (10 ml/100 cm² de área de membrana) de la solución de hibridación a una temperatura de 37°C.
3. Se adicionó esta solución de hibridación a una bolsita plástica con la membrana, se selló la bolsita y se prehibridó la membrana durante 30 minutos con agitación suave, y a una temperatura de 37°C, en el agitador/incubador de marca Heidilph.

b) Hibridación:

1. Se agregó un volumen adecuado (3,5 ml/100 cm² de área de membrana) de la sonda kCR marcada con digoxigenina, a la solución precalentada de hibridación, y se mezcló bien pero sin causar burbujeo.
2. Se incubó durante 14 horas con agitación suave a una temperatura de 37°C, en el agitador/incubador (Heidilph UNIMAX 1010).

Figura 14. Vista de la membrana durante el proceso de hibridación.



c) Almacenamiento del exceso de sonda marcada con digoxigenina:

Una vez completada la etapa de hibridación, la solución de hibridación junto con el exceso de sonda marcada con digoxigenina, fueron almacenadas a -20°C hasta una próxima hibridación con otra membrana de nylon.

d) Poshibridación:

1. Se lavó la membrana dos veces, durante 5 minutos, en una solución 2X SSC, 0,1% SDS, bajo agitación manual, a temperatura ambiente.
2. Se lavó dos veces, durante 15 minutos, en solución 0,5X SSC, 0,1% SDS a una temperatura de 55°C en el agitador/incubador [DIG APPLICATION MANUAL, 2000].

4.5.3 Detección de la hibridación mediante quimioluminiscencia

Todas las incubaciones de esta parte del procedimiento se hicieron con agitación y a una temperatura de 42°C. Los pasos que se siguieron, según el protocolo del fabricante del kit de marcaje y detección, fueron los siguientes:

1. Se lavó la membrana previamente en solución tampón de lavado (ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M; 0,3% Tween 20; pH 7,5) durante 3 minutos.
2. Se incubó durante 30 minutos en 100 ml de la solución de bloqueo (dilución 1:10 de la solución original del kit en solución tampón de ácido maleico: ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M; pH 7,5).
3. Se incubó durante 30 minutos en 20 ml de la solución de antidigoxigenina (20 ml de la misma solución de bloqueo del paso anterior y 2µl del vial del anticuerpo antidigoxigenina del kit).
4. Se lavó dos veces (durante 15 minutos cada una) en 100 ml de solución tampón de lavado.
5. Se equilibró durante 5 minutos en 20 ml de solución tampón de detección (Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M; pH 9,5).
6. Se ubicó la membrana con el lado del ADN hacia arriba dentro de una bolsita plástica esterilizada y se aplicó 1 ml de solución lista para usar de CSPD del kit sobre la membrana. Inmediatamente se distribuyó este sustrato uniformemente y sin dejar burbujas de aire sobre la membrana y se selló la bolsita.
7. Se incubó la membrana durante 10 minutos a 37°C.
8. Se expuso la membrana a una película de rayos X corriente durante una hora y media en un cassette (Kodak).
9. Se procesó la película de rayos X en la máquina de revelado (Kodak X-OMAT 2000) del departamento de Radiología del Hospital Universitario de Santander [DIG APPLICATION MANUAL].

Figura 15. Vista de la membrana en el cassette.



En esta fotografía se observa la membrana debidamente sellada, ya que es de extrema importancia que ni una gota de solución toque el cassette o la película de rayos X, y pegada en sus bordes con cinta de enmascarar para prevenir cualquier movimiento de la membrana que distorsione la imagen en la película.

En la siguiente figura se ilustra el procesamiento de la película, el cual es bastante sencillo en vista de que en una sola máquina procesadora se realiza el revelado, fijación y secado de la película de rayos X.

Figura 16. Vista del revelado de la película de rayos X



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS DE LA PCR DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CON LOS CEBADORES Tcz1/Tcz2

En todas las PCR que se realizaron, se utilizó el ADN de una cepa de *Trypanosoma cruzi* como control positivo y una muestra sin ADN como control negativo. En todas las fotografías de los geles de agarosa se calculó el peso molecular de las bandas utilizando el programa de Photo-CaptMW. La lista completa de estos resultados se encuentra en el anexo 1. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos con la PCR Tcz1/Tcz2:

Tabla 5. Resultados obtenidos con la PCR Tcz1/Tcz2.

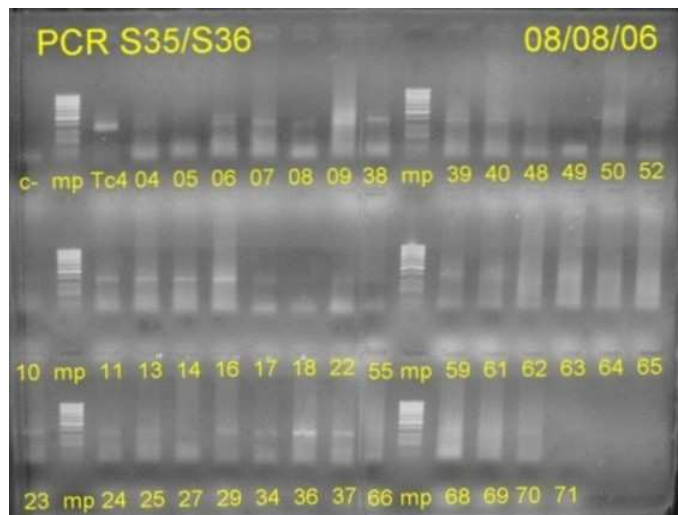
Fase de la enfermedad	Número total de muestras	Número de positivos	Porcentaje de positivos	Número de negativos	Porcentaje de negativos
Fase I	50	4	8%	46	92%
Fase II	21	1	4,76%	20	95,24%
Fase III	82	0	0%	82	100%
Fase IV	27	1	3,7%	26	96,3%

Cabe resaltar que se detectaron positivos en muestras de ADN de pacientes chagásicos en fase I principalmente. Esto puede ser una señal de que en las fases crónicas de la enfermedad los parásitos estén principalmente en los tejidos, mas no en la sangre [TARLETON, 2003].

5.2 RESULTADOS DE LA PCR DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CON LOS CEBADORES S35/S36

Análogamente a lo descrito en el ítem anterior, en todas las PCR que se realizaron, se utilizó el ADN de una cepa de *Trypanosoma cruzi* como control positivo y una muestra sin ADN como control negativo, y se calcularon los pesos moleculares de las bandas de las muestras mediante el programa Phot-CaptMW. A continuación se muestra una foto de un gel de esta PCR:

Figura 17. Fotografía del gel de agarosa con las muestras amplificadas por PCR con el par de iniciadores S35/S36.



En esta fotografía se observa la banda de 330 bp en las muestras 04, 13, 14, 16, 23, 34, 37, 38, 39, 59, 63, 64, 68, 69. Adicionalmente, las muestras 06, 07, 08, 09, 10, 11, 17, 22, 24, 25, 27, 29, 36, 40, 48, 50 y 61 amplificaron una banda de 520 bp. Todas las muestras de esta fotografía corresponden a pacientes chagásicos sintomáticos, es decir personas que se encuentran en las fases II, III y IV de la enfermedad de Chagas. La lista completa de los resultados de ambas PCR se encuentra en los anexos 1 y 2.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos con la PCR S35/S36:

Tabla 6. Resultados obtenidos con la PCR S35/S36.

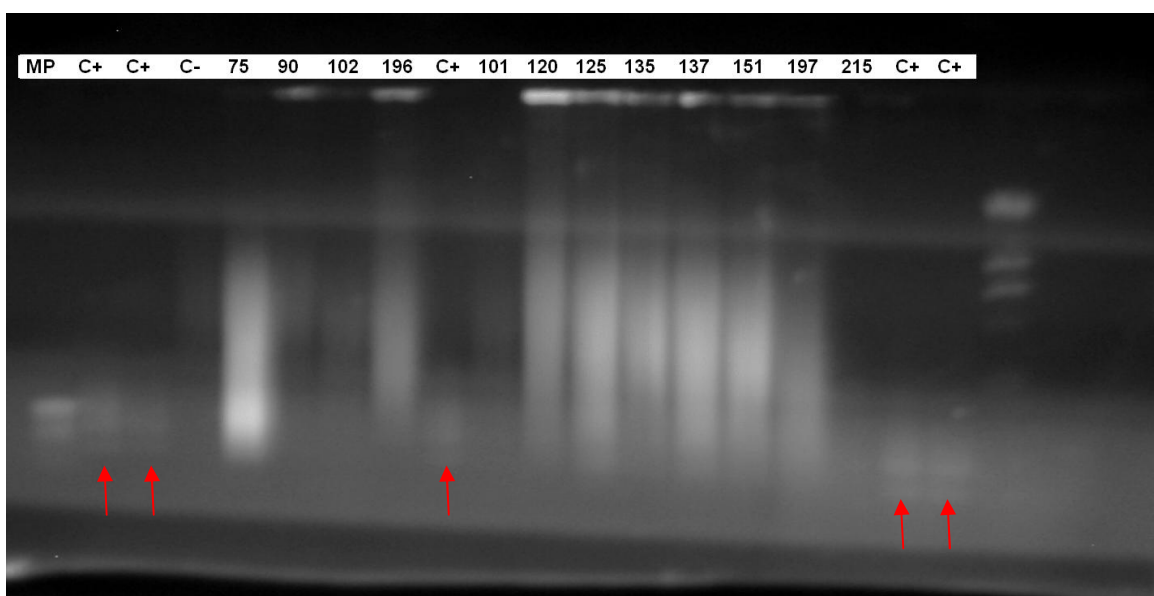
Fase de la enfermedad	Número total de muestras	Número de positivos	Porcentaje de positivos	Número de negativos	Porcentaje de negativos
Fase I	50	10	20%	40	80%
Fase II	21	3	14,29%	18	85,71%
Fase III	82	23	28%	59	72%
Fase IV	27	8	29,63%	19	70,37%

Esta PCR es notablemente más sensible que la anterior, aunque menos específica, ya que detecta una secuencia que es común en todos los tripanosomátidos [AVILA, 1993]. Sin embargo, de nuevo se observa que la mayoría de las muestras de todas las fases de la enfermedad dan un resultado negativo. Además de eso cabe resaltar la presencia de esa banda inespecífica de 520 bp, en vista de que dicha banda no se observó en las muestras de los controles positivos de ADN amplificado del parásito, se asume que fue inadvertidamente amplificada a partir de un segmento muy similar presente en el genoma humano [GOMES, MACEDO, 1998]. El resto de fotos de ambas PCR's se encuentran en los anexos 3 y 4.

5.3 RESULTADOS DE LA DOBLE DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *BamHI* Y *EcoRI*

Solamente se realizó esta doble digestión con las muestras positivas de la PCR con los cebadores S35 y S36 y que además tuvieran una concentración igual o mayor a $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por lo cual se descartaron las muestras 89 y 237, correspondientes a pacientes asintomáticos y las muestras 14, 16, 23, 39, 94, 113, 139, 140 y 142, correspondientes a pacientes sintomáticos. En seguida se muestra una foto que ilustra el aspecto de las muestras de ADN genómico digeridas:

Figura 18. Fotografía del gel de agarosa con las muestras de ADN digeridas.

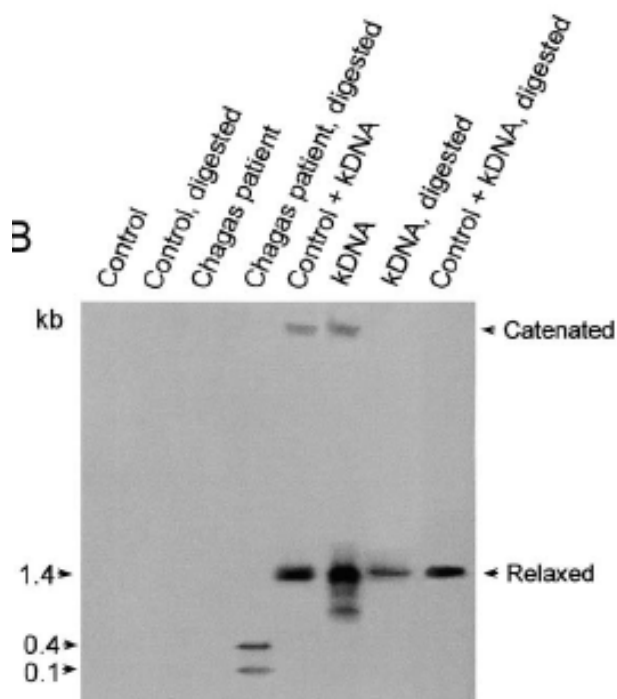


En esta fotografía se observa la apariencia general de las muestras digeridas. En general se obtienen barridos cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad original de ADN de la muestra. En este gel se utilizó como control positivo 5 muestras de ADN de la cepa 338 de *T.cruzi I* amplificado por PCR S35/S36, las cuales están señaladas con flechitas rojas. Las demás fotos de estos ensayos se encuentran en el anexo 5.

5.4 RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN EN LAS MEMBRANA DE NYLON CON LA SONDA DIG-kCR

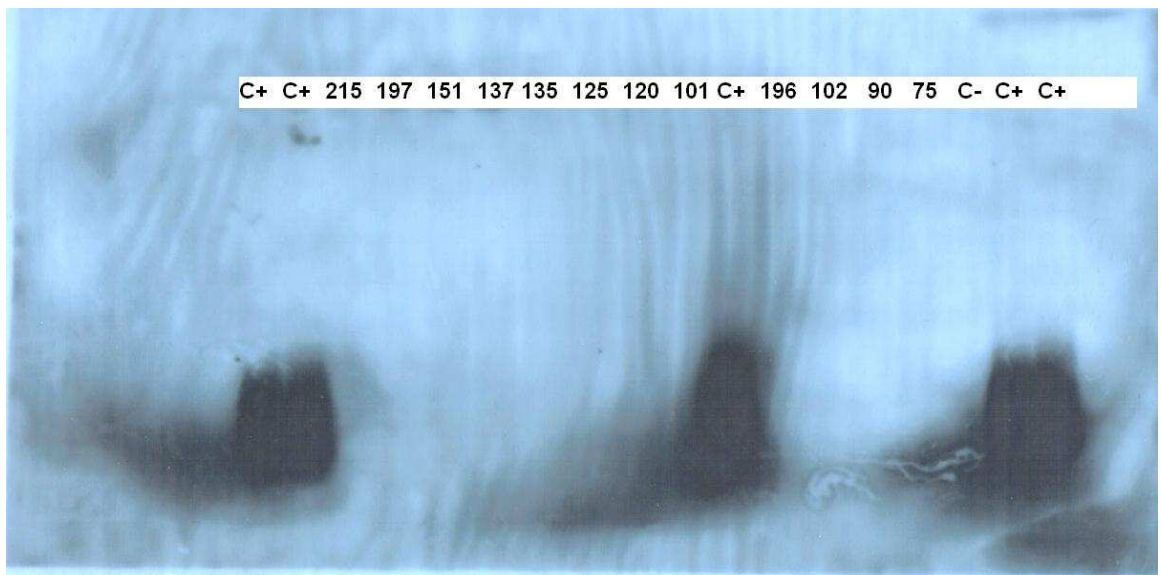
En los montajes de cada gel de agarosa se utilizó como control negativo una muestra de ADN de sangre periférica de una persona que no está infectada de *Trypanosoma cruzi*. Como controles positivos se utilizaron un ADN genómico extraído de un cultivo de parásitos de *Trypanosoma cruzi* I cepa 338, así como muestras de esta misma cepa amplificadas mediante la PCR con los cebadores S35 y S36. La razón por la que se utilizó este amplificado es por lo reportado en el artículo de Nitz, Teixeira y colaboradores, en el cual las bandas de la presunta inserción de kDNA tienen tamaños de 100bp y 400bp, las cuales son más próximas al tamaño del amplificado (330bp) que a la banda de 1400bp que hibrida en la muestra de ADN genómico del parásito [NITZ, 2004]. En seguida se muestra una autorradiografía del estudio realizado por Nitz y colaboradores:

Figura 19. Imagen de la autorradiografía de hibridación. Tomado de Nitz, N. Gomes, C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. Cell. 118 (2004) 176.



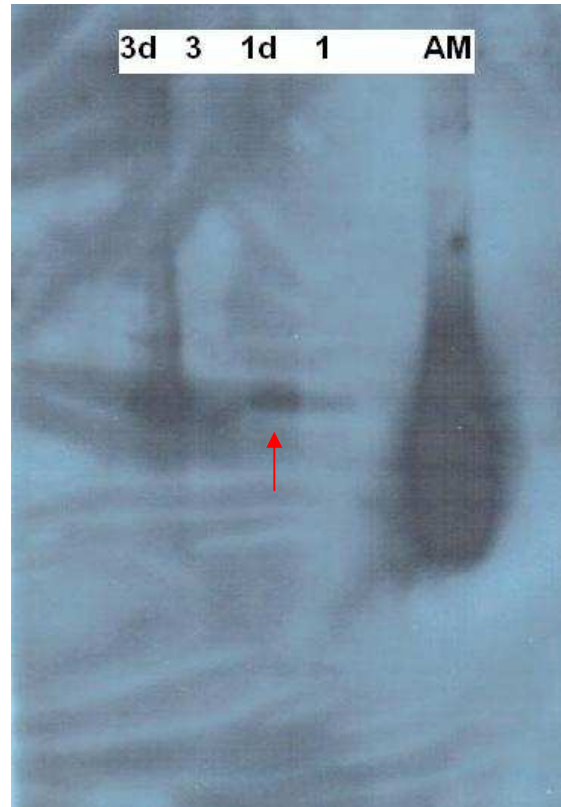
No se observó hibridación de ninguna de las muestras de ADN de los pacientes chagásicos, ni sintomáticos ni asintomáticos, con la sonda DIG-kCR. A continuación se muestran dos de las membranas obtenidas en las pruebas realizadas:

Figura 20. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana correspondiente al gel de agarosa de la figura 18.



En esta imagen se observa que sólo las 5 muestras de ADN amplificado de la cepa 338 de *T. cruzi I* hibridaron con la sonda DIG-kCR. (Recuérdese que lo que se observa en la membrana es una imagen especular de lo que se observa en la fotografía del gel de agarosa correspondiente, en este caso, el gel mostrado en la figura 18). La aparición de este “background” en todas las autorradiografías obtenidas se debe principalmente a que no fue posible evitar el contacto entre la membrana de nylon y la bolsa plástica, ya que el manual del fabricante recomienda que las membranas deben nadar libremente en las soluciones de hibridación y detección al estar contenidas en las bolsitas plásticas, sin embargo, debido a la limitación de recursos para la cantidad de muestras que se querían analizar, no se pudo seguir esta recomendación de manera estricta. Además de esto, fue imposible a su vez evitar la presencia de burbujas en cada paso que requería realizarse en una bolsa plástica debido al modo artesanal de sellado de las mismas [DIG APPLICATION MANUAL, 2000].

Figura 21. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana con muestras de ADN genómico del parásito, digerido y sin digerir.



Todas las muestras de esta imagen de hibridación corresponden a la cepa 338 de *T. cruzi* I. La muestra denominada AM es un amplificado con PCR S35/S36, las muestras enumeradas con 1 y 3 hacen referencia a la cantidad de muestra de ADN genómico sembrado en el gel de agarosa (1 y 3 μ l, respectivamente) las muestras 1d y 3d son estas mismas muestras sometidas a la doble digestión con las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI*.

Se observó la hibridación de la muestra de ADN del parásito amplificado por PCR S35/S36 (en el lado derecho). Por otro lado, se obtuvo la misma banda de 1400bp que obtuvieron Nitz y colaboradores en la figura 19, en la muestra de ADN genómico de la cepa 338 de *T. cruzi* I (señalada con flechita roja). Nótese que a diferencia del kDNA purificado que utilizó Nitz, esta muestra contiene el ADN total del parásito, tanto nuclear como extranuclear (kDNA), y a pesar de ello se observó esta banda con una intensidad significativa, teniendo en cuenta que el kDNA conforma sólo el 15% del ADN total del parásito. Esto confirma la sensibilidad de esta técnica utilizando los reactivos del kit de Roche de marcaje enzimático aleatorio con digoxigenina, ya que la

hibridación utilizada por Nitz y colaboradores se llevó a cabo con sondas marcadas radiactivamente [NITZ, 2004]. Se asume que la mayor intensidad observada en las muestras digeridas se debe a la mayor disponibilidad de estos fragmentos a hibridarse con la sonda DIG-kCR, puesto que sus análogos sin digerir se encuentran en un estado superenrollado que dificulta el acceso de la sonda para la correspondiente hibridación.

Esta ausencia de inserción del kDNA del parásito en las muestras de los pacientes estudiadas sugiere que el resultado de las PCR's dependen exclusivamente de la cantidad de parásito presente en la sangre en el momento de la toma de dicha muestra.

6. CONCLUSIONES

A partir de resultados de las PCR's se constató que el parásito está más presente en la sangre de aquéllos pacientes que se encuentran en la primera fase de la enfermedad, es decir en personas asintomáticas, ya que en los pacientes que se encuentran en fases más avanzadas de la enfermedad, el parásito se encuentra principalmente alojado en los tejidos afectados, concretamente en el tejido cardíaco.

Los escasos resultados positivos de las PCR's en muestras de sangre provenientes de todas las fases de la enfermedad de Chagas, en su forma de cardiomiopatía, indican que tal vez sea necesario escoger otro criterio de selección para clasificar las muestras más aptas para el ensayo de hibridación, en vista de que no se sabe con precisión que tan poco aptas sean las muestras que dieron resultados negativos.

El kDNA de las cepas de *Trypanosoma cruzi I* presentes en las muestras analizadas de sangre de pacientes chagásicos de esta región no se inserta en las células sanguíneas de los mismos. Esto significa que la hipótesis de la inserción del kDNA del parásito en el genoma del paciente no sería la más adecuada para explicar la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Sin embargo haría falta un análisis de mayor cobertura de muestras para determinar si de verdad se debe descartar por completo esta hipótesis.

Se comprobó lo altamente sensible que es la técnica de marcaje enzimático aleatorio con digoxigenina, lo cual es uno de los resultados más satisfactorios de este estudio, puesto que permite realizar de manera completamente confiable este tipo de pruebas de marcaje de sondas de ADN y/o oligonucleótidos sin necesidad de utilizar elementos radioactivos, los cuales no sólo están por el momento por fuera del alcance del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la UIS, sino que también son intrínsecamente más delicados de manipular, almacenar y desechar.

También se corroboró especificidad de esta técnica, en vista de que sólo se obtuvo la hibridación correspondiente a la reportada por Nitz y colaboradores en la muestra de ADN genómico del parásito.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda repetir la metodología de este estudio para muestras de ADN provenientes de tejidos cardíacos, y revisar si en ese caso ocurre la inserción del kDNA del parásito en el genoma del paciente.

Cabe resaltar la importancia de hacer un estudio que abarque un mayor número de muestras, con el fin de determinar de una manera más rotunda si esta hipótesis de la inserción de kDNA es plausible o no.

Finalmente se sugiere usar otros marcadores, otras sondas basadas en elementos móviles del genoma del parásito para constatar si ocurre la hibridación de estas sondas con las mismas muestras analizadas en este estudio, así como con otras muestras de ADN provenientes de tejido cardíaco.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B. DNA replication and recombination. *Nature*. 421 (2003) 431-435.

Andrade, L; Machado, C, Chiari, E; et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* 100 (2002) 269-275.

Añez, N; Crisante, G; Da Silva F; et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuela patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop. Med. Int. Health.* 9 (2004) 1319-1326.

Avila, H; Pereira, J; Thiemann, O; 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. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 2421-2426.

Baptista, C; Vêncio, R; Abdala, S; et al. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol. & Biochem. Parasitol.* 150 (2006) 238-248.

Barnabe, C; Brisse, S; Tibayrenc, M. Population structure and genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitol.* 120 (2000) 513-526.

Bosseno, M; Barnabe, C; Magallón, E. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 627-632.

Buscaglia, C; Noia, J. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas' disease. *Microbes & Infect.* 5 (2003) 419-427.

Cancado, J. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 44, (2002) 29-37.

Cevallos, A.M; Hernández, R. [en línea] Edit. Unam, México, (2003). Disponibilidad<<http://biblioweb/dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap15/capitulo.html>>

Davila, A; Lukes, J. Towards a framework for the evolutionary genomics of Kinetoplastids: what kind of data and how much? *Kinetoplast. Biol. & Disease.* 2 (2003) 16-19.

División De Publicaciones UIS. La UIS y la investigación. Cátedra libre. N° 78 (2005) 10.

Engman, D; Leon, J. Pathogenesis of Chagas heart disease: a role of autoimmunity. *Acta Tropica.* 81 (2002) 123-132.

Freitas, J; Lages-Silva, E; Crema, E; et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 411-417.

Gaunt, M; Yeo, M; Frame, I. Mechanism of genetic exchange in American Trypanosomes. *Nature.* 421 (2003) 936-939.

Gomes, M; Macedo, A; Vago, A. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.* 88 (1998) 28-33.

Hyland, K; Engman, D. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trend. Parasitol.* 22 (2006) 101-102.

Iwai, L; Juliano, M; Juliano, L; et al. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J. Autoimmun.* 24 (2005) 111-117.

Jaramillo, N; Moreno, J; Triana, O; Arcs-Burgos, M; Muñoz, S; Solari, A. Genetic structure and phylogenetic relationships of colombian *Trypanosoma cruzi* populations

as determined by schizodeme and isoenzyme markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (1999) 986-993.

Jones, E; Colley, D; Tostes, S; et al. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: (1993) 348-357.

Junqueira, A; Degraeve, W; Brandao, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trend. Parasitol.* 21 (2005) 270-273.

Kalil, J; Cunha-Neto, E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol. Today.* 12 (1996) 396-399.

Kierszenbaum, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trend. Parasitol.* 21 (2005) 513-516.

Liu, M. DNA vaccines: a review. *J. Int. Med.* 253 (2003) 402-410.

Machado, C; Pinto, L; McCulloch, R; Teixeira, S. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Rev. Mutat. Research.* 612 (2006) 40-57.

Macedo, A; Machado, C; Oliveira, R; Pena, S. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99 (2004) 1-12.

Montilla, M; Guhl, F; Jaramillo, C; et al. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae colombian populations. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* 66 (2002) 394-400.

Morell, M; Thomas, M; Caballero, T; et al. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 24 (2006) 7046-7055.

- Moser, D; Kirchoff, L; Donelson, J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27 (1989) 1477-1482.
- Mullis, K; Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155 (1987) 335-350.
- Nelson, D; Cox, M. Lehninger's Principles of Biochemistry. 4th Edition. New York (2005) 921-922.
- Nitz, N. Gomes, C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. Cell. 118 (2004) 175-186.
- Ochoa, S; Leloir, L.F; Oró, J; Sols, A. Bioquímica y biología molecular. Editorial Salvat. España (1988) 507-509.
- Pérez, C; Padilla, M; Diosque, P; Basombrío, M. *Trypanosoma cruzi*: infectivity modulation of a clone after passage through different hosts. Exp. Parasitol. 114 (2006) 89-93.
- Pimenta, J. Análises Filogenéticas Populacionais em *T. cruzi* a Partir de Estudos de Microsatélites Polimórficos de DNA. Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil (2002).
- Rangel, M.J. Detección del ADN de Papiloma Virus Humano en lesiones precancerosas y cancerosas de cuello uterino por Reacción en Cadena de la Polimerasa, en Bucaramanga, Santander. Ediciones UIS. Bucaramanga (2002) 43-50.
- Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization. Germany (2000).
- Salazar, A; Schijman, A; et al. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. Acta Tropica 100 (2006) 110-118.

Sanbrook, Russell. Molecular cloning, a laboratory manual. Vol 1, 3ª Ed. CHSL Press. Nueva York (2001).

Serpa Flórez Fernando: Médicos, Medicina e Historia. [en línea] (2003). Disponibilidad <<http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/ag-ooedito.htm>>

Simoës-Barbosa, A; Argañaraz, E; Barros, A; Nitz, N; Teixeira, A, et al. Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (2006) 833-843.

Tarleton, R. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 31 (2001) 550-554.

Tarleton, R. Chagas disease: a role for autoimmunity? Trend. Parasitol. 19 (2003) 447-451.

Telleria, J; Lafay, B; Virreira, M; et al. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. Experim. Parasitol. 114 (2006) 279-288.

Teixeira, A.R.; Argañaraz, E.R; Freitas, L.H; et al. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. Mutat. Research. 305 (1994) 197-209.

Vago, A; Andrade, L; Leite, A; et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am. J. Pathol. 156 (2000) 1805-1809.

Wickstead, B; Ersfeld, K; Gull, K. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. Microbiol. & Mol. Biol. reviews 67 (2003) 306-375.

WU, W. Methods in Gene Biotechnology. Florida (1997) 153-177.

Zafra, G; Flórez, O; Morillo, C; Martín, J; González, C.I. Inmunogenética de la enfermedad de Chagas. *Salud UIS*. 38 (2006) 76-77.

Zingales, B; Stolf, B; Souto, R; et al. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 94 (1999) 159-164.

9. ANEXOS

ANEXO 1. RESULTADOS DE LAS PCR'S DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES ASINTOMÁTICOS

NÚMERO	CÓDIGO	FASE	PCR (Tcz1/Tcz2)	PCR (S35/S36)
1	CHS042	I	negativo	negativo
2	CHS043	I	negativo	negativo
3	CHS045	I	negativo	negativo
4	CHS047	I	negativo	negativo
5	CHS054	I	negativo	negativo
6	CHS067	I	negativo	negativo
7	CHS075	I	negativo	positivo
8	CHS077	I	negativo	negativo
9	CHS079	I	negativo	negativo
10	CHS082	I	negativo	negativo
11	CHS084	I	negativo	negativo
12	CHS088	I	negativo	negativo
13	CHS089	I	negativo	positivo
14	CHS090	I	negativo	positivo
15	CHS093	I	negativo	negativo
16	CHS097	I	negativo	negativo
17	CHS098	I	negativo	negativo
18	CHS102	I	negativo	positivo
19	CHS105	I	negativo	negativo
20	CHS107	I	negativo	negativo
21	CHS122	I	negativo	negativo
22	CHS123	I	negativo	negativo
23	CHS126	I	negativo	negativo
24	CHS145	I	negativo	negativo
25	CHS146	I	negativo	negativo
26	CHS147	I	negativo	negativo
27	CHS148	I	negativo	negativo
28	CHS157	I	negativo	negativo
29	CHS158	I	negativo	negativo
30	CHS160	I	negativo	negativo
31	CHS163	I	negativo	negativo
32	CHS165	I	negativo	negativo
33	CHS167	I	negativo	negativo
34	CHS168	I	negativo	negativo
35	CHS170	I	negativo	negativo
36	CHS189	I	negativo	negativo
37	CHS190	I	negativo	negativo
38	CHS191	I	negativo	negativo
39	CHS192	I	negativo	negativo

40	CHS195	I	negativo	negativo
41	CHS196	I	positivo	positivo
42	CHS198	I	positivo	positivo
43	CHS221	I	negativo	negativo
44	CHS224	I	positivo	positivo
45	CHS226	I	negativo	negativo
46	CHS228	I	negativo	negativo
47	CHS229	I	negativo	negativo
48	CHS233	I	positivo	positivo
49	CHS236	I	negativo	positivo
50	CHS237	I	negativo	positivo

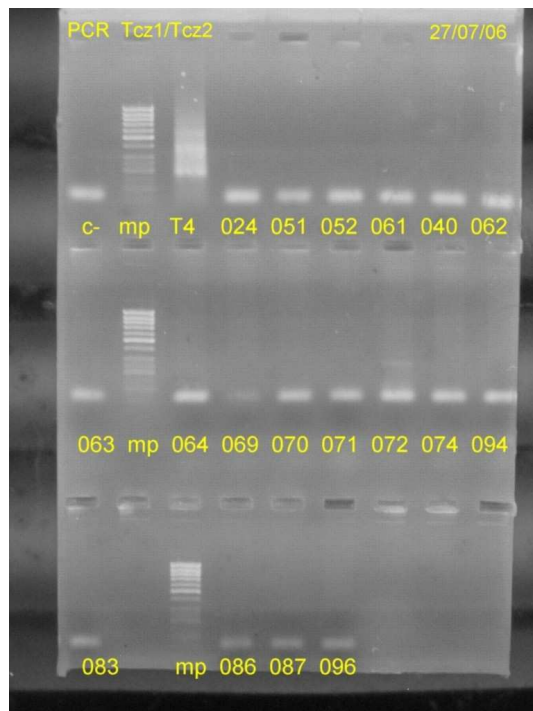
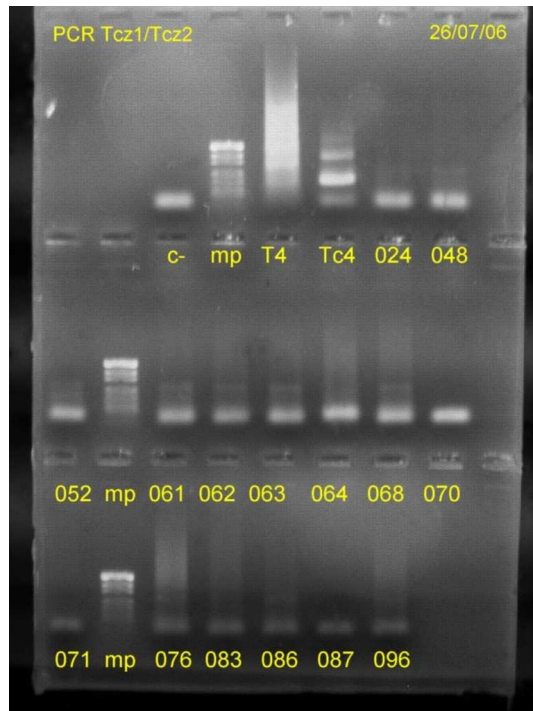
ANEXO 2. RESULTADOS DE LAS PCR'S DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES SINTOMÁTICOS

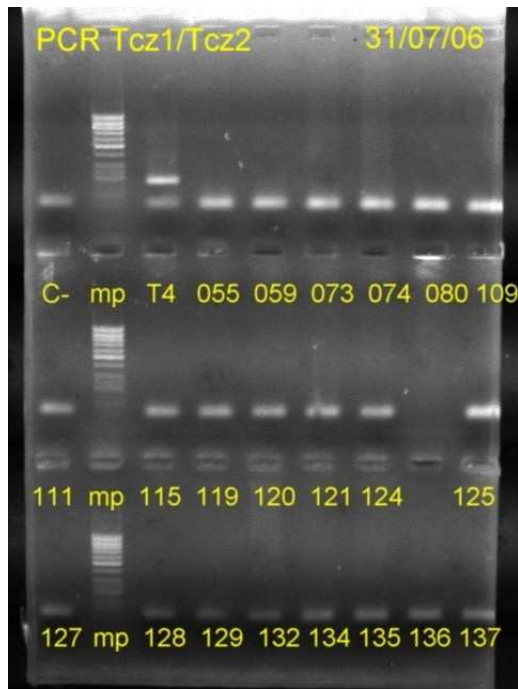
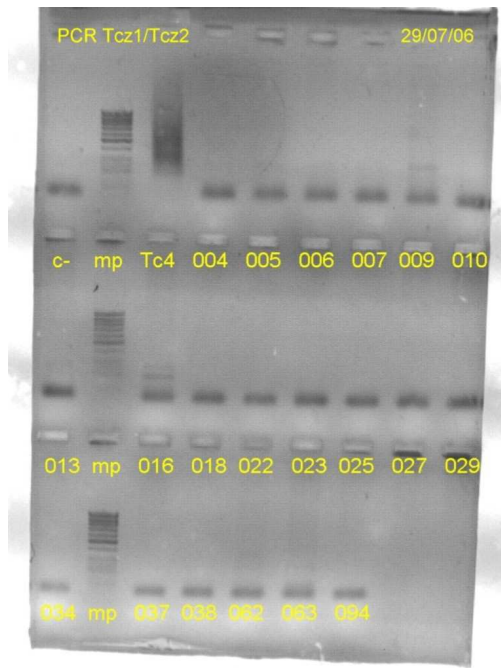
NÚMERO	CÓDIGO	FASE	PCR (Tcz1/Tcz2)	PCR (S35/S36)
1	CHS059	II	negativo	positivo
2	CHS073	II	negativo	negativo
3	CHS074	II	negativo	negativo
4	CHS080	II	negativo	negativo
5	CHS114	II	negativo	negativo
6	CHS118	II	positivo	negativo
7	CHS134	II	negativo	negativo
8	CHS137	II	negativo	positivo
9	CHS173	II	negativo	negativo
10	CHS175	II	negativo	negativo
11	CHS177	II	negativo	negativo
12	CHS217	II	negativo	positivo
13	CHS219	II	negativo	negativo
14	CHS222	II	negativo	negativo
15	CHS223	II	negativo	negativo
16	CHS225	II	negativo	negativo
17	CHS230	II	negativo	negativo
18	CHS275	II	negativo	negativo
19	CHS278	II	negativo	negativo
20	CHS289	II	negativo	negativo
21	CHS294	II	negativo	negativo
22	CHS018	III	negativo	negativo
23	CHS023	III	negativo	positivo
24	CHS024	III	negativo	negativo
25	CHS025	III	negativo	negativo
26	CHS027	III	negativo	negativo
27	CHS029	III	negativo	negativo
28	CHS036	III	negativo	negativo
29	CHS039	III	negativo	positivo
30	CHS048	III	negativo	negativo
31	CHS049	III	negativo	negativo
32	CHS050	III	negativo	negativo
33	CHS052	III	negativo	negativo
34	CHS061	III	negativo	negativo
35	CHS062	III	negativo	negativo
36	CHS063	III	negativo	positivo
37	CHS064	III	negativo	positivo
38	CHS065	III	negativo	negativo
39	CHS066	III	negativo	negativo
40	CHS068	III	negativo	positivo
41	CHS069	III	negativo	positivo
42	CHS070	III	negativo	negativo

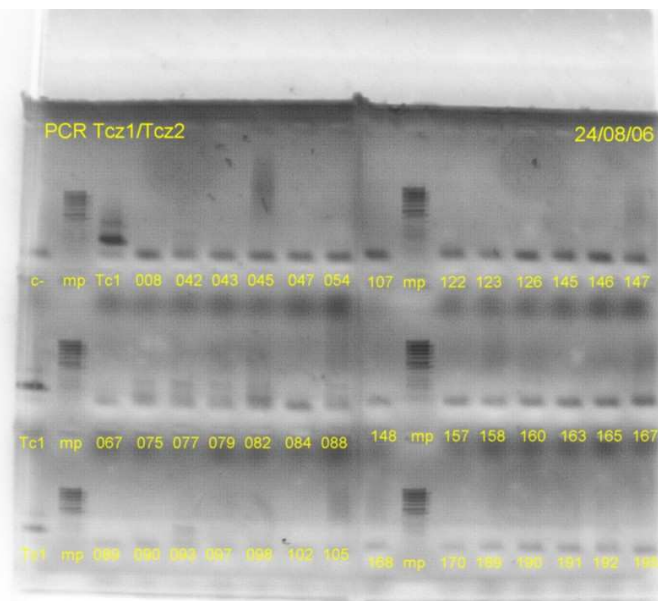
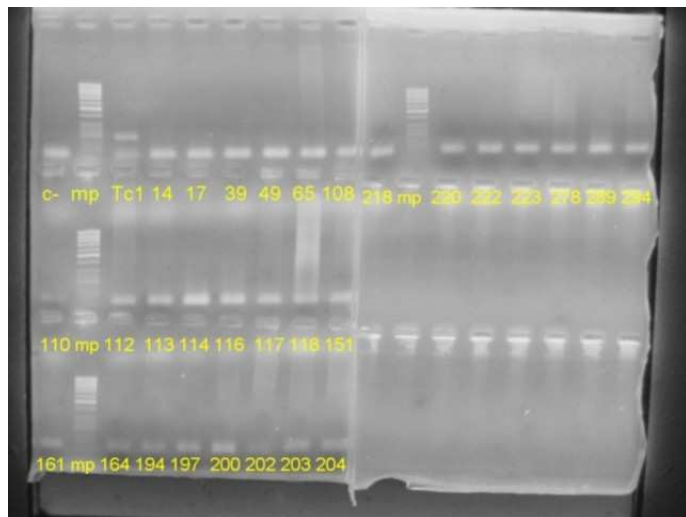
43	CHS071	III	negativo	negativo
44	CHS072	III	negativo	positivo
45	CHS076	III	negativo	negativo
46	CHS083	III	negativo	negativo
47	CHS086	III	negativo	negativo
48	CHS087	III	negativo	negativo
49	CHS094	III	negativo	positivo
50	CHS096	III	negativo	negativo
51	CHS099	III	negativo	negativo
52	CHS100	III	negativo	negativo
53	CHS101	III	negativo	positivo
54	CHS109	III	negativo	negativo
55	CHS110	III	negativo	negativo
56	CHS113	III	negativo	positivo
57	CHS115	III	negativo	positivo
58	CHS119	III	negativo	negativo
59	CHS120	III	negativo	positivo
60	CHS121	III	negativo	negativo
61	CHS124	III	negativo	negativo
62	CHS125	III	negativo	positivo
63	CHS127	III	negativo	negativo
64	CHS128	III	negativo	positivo
65	CHS129	III	negativo	negativo
66	CHS132	III	negativo	negativo
67	CHS135	III	negativo	positivo
68	CHS136	III	negativo	negativo
69	CHS139	III	negativo	positivo
70	CHS140	III	negativo	positivo
71	CHS142	III	negativo	positivo
72	CHS144	III	negativo	negativo
73	CHS150	III	negativo	negativo
74	CHS151	III	negativo	positivo
75	CHS153	III	negativo	negativo
76	CHS154	III	negativo	negativo
77	CHS155	III	negativo	negativo
78	CHS156	III	negativo	negativo
79	CHS161	III	negativo	negativo
80	CHS164	III	negativo	negativo
81	CHS172	III	negativo	positivo
82	CHS174	III	negativo	negativo
83	CHS178	III	negativo	negativo
84	CHS179	III	negativo	negativo
85	CHS194	III	negativo	negativo
86	CHS197	III	negativo	positivo
87	CHS200	III	negativo	negativo
88	CHS201	III	negativo	negativo
89	CHS202	III	negativo	negativo
90	CHS203	III	negativo	positivo

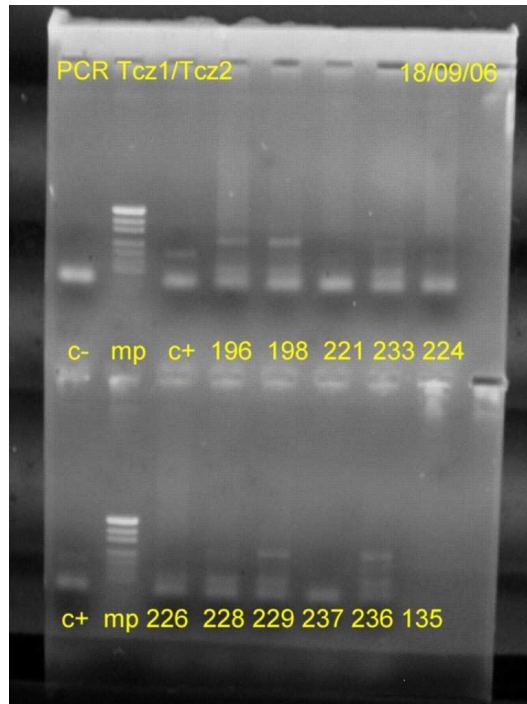
91	CHS204	III	negativo	negativo
92	CHS209	III	negativo	negativo
93	CHS215	III	negativo	positivo
94	CHS218	III	negativo	negativo
95	CHS220	III	negativo	negativo
96	CHS231	III	negativo	negativo
97	CHS232	III	negativo	negativo
98	CHS253	III	negativo	negativo
99	CHS266	III	negativo	negativo
100	CHS267	III	negativo	negativo
101	CHS268	III	negativo	negativo
102	CHS270	III	negativo	negativo
103	CHS272	III	negativo	negativo
104	CHS004	IV	negativo	positivo
105	CHS005	IV	negativo	negativo
106	CHS006	IV	negativo	negativo
107	CHS007	IV	negativo	negativo
108	CHS008	IV	negativo	negativo
109	CHS009	IV	negativo	negativo
110	CHS010	IV	negativo	negativo
111	CHS011	IV	negativo	negativo
112	CHS013	IV	negativo	positivo
113	CHS014	IV	negativo	positivo
114	CHS016	IV	positivo	positivo
115	CHS017	IV	negativo	negativo
116	CHS022	IV	negativo	negativo
117	CHS034	IV	negativo	positivo
118	CHS037	IV	negativo	positivo
119	CHS038	IV	negativo	positivo
120	CHS040	IV	negativo	negativo
121	CHS055	IV	negativo	negativo
122	CHS092	IV	negativo	positivo
123	CHS108	IV	negativo	negativo
124	CHS111	IV	negativo	negativo
125	CHS112	IV	negativo	negativo
126	CHS116	IV	negativo	negativo
127	CHS117	IV	negativo	negativo
128	CHS138	IV	negativo	negativo
129	CHS141	IV	negativo	negativo
130	CHS199	IV	negativo	negativo

ANEXO 3. FOTOGRAFIAS DE LOS RESULTADOS DE LA PCR Tcz1/Tcz2

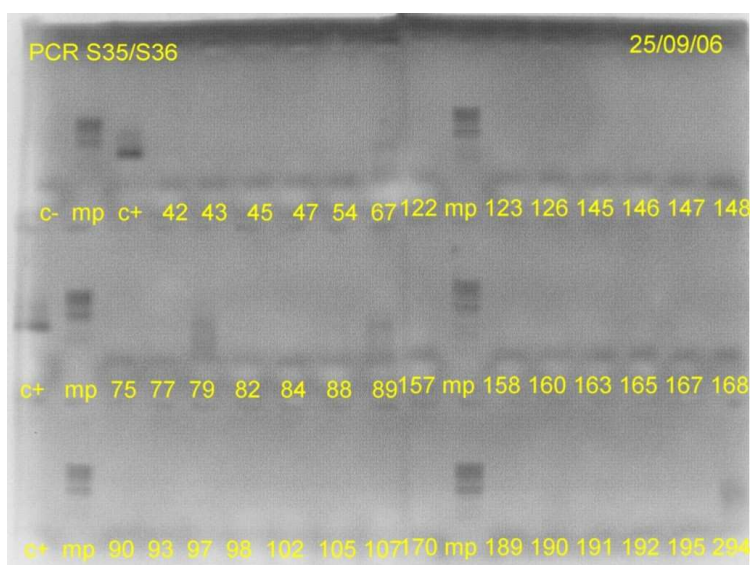
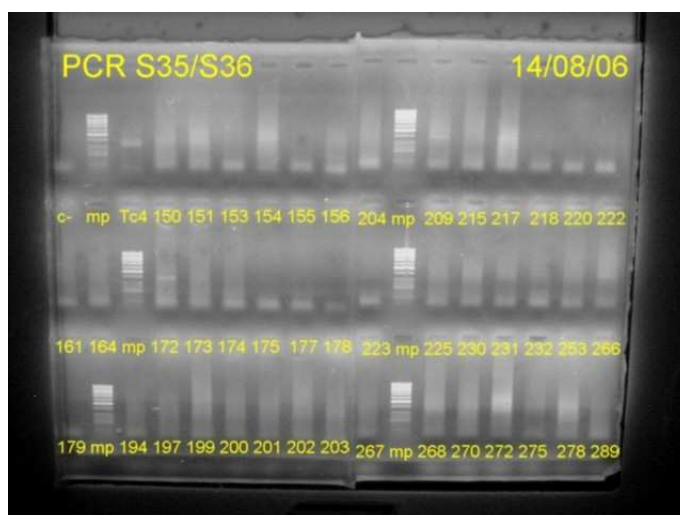
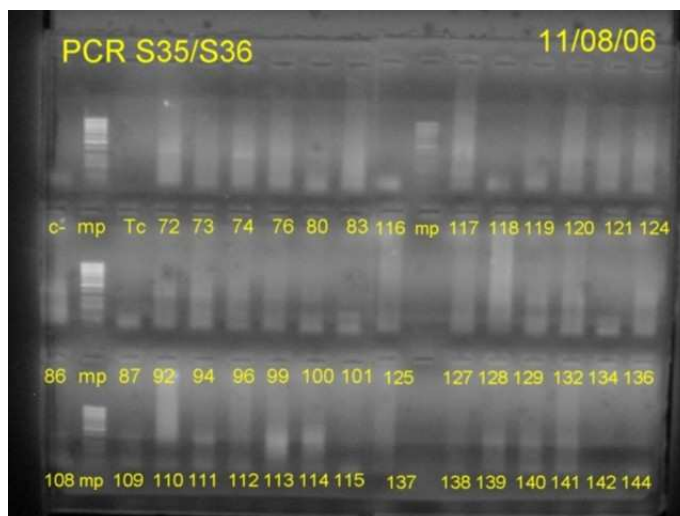


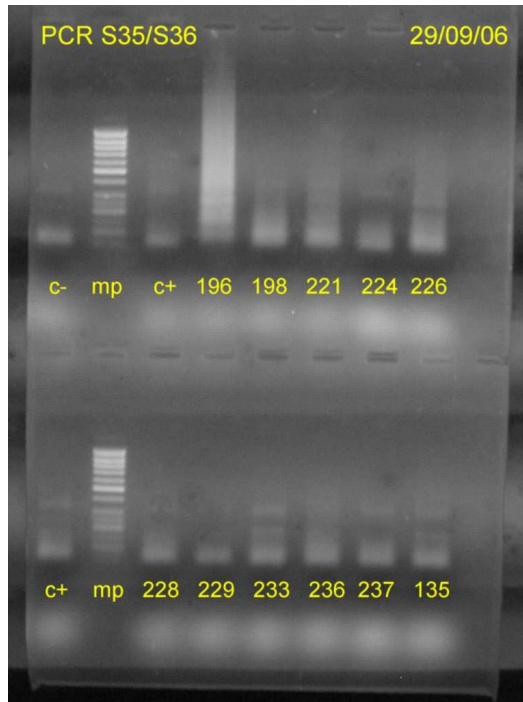






ANEXO 4. FOTOGRAFÍAS DE LOS RESULTADOS DE LA PCR S35/S36





ANEXO 5. FOTOGRAFÍAS DE LOS RESULTADOS DE LA DOBLE DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *EcoRI* y *BamHI*

