

Estudio de la variabilidad de seis cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

Pilar Rodríguez ¹, Marcela Escalante ¹, Hugo Díez ¹, Claudia Cuervo ¹, Marleny Montilla ², Rubén Santiago Nicholls ², Ignacio Zarante ³, Concepción Puerta ¹

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

² Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

³ Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

La enfermedad de Chagas, causada por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, constituye un problema de salud pública en Colombia en donde diferentes informes indican la presencia de heterogeneidad entre poblaciones del parásito. En este estudio se analizaron seis cepas colombianas de *T. cruzi*, procedentes de distintas regiones geográficas del país, huéspedes y ciclos de transmisión, mediante las técnicas de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD), isoenzimas y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLP), usando como sonda el gen de 1,2 kb que codifica para la histona H2A del parásito. Se encontró que las distancias genéticas entre los aislados varían considerablemente, ubicándose en el rango de 0,61 a 0,99, para el caso de los perfiles de RAPD (cebadores M13F y M13R), de 0 a 0,81, para el caso de los perfiles de RFLP (5 endonucleasas) y de 0,10 a 0,55, para el caso de las isoenzimas (13 sistemas enzimáticos). El elevado grado de variabilidad exhibido por los aislados colombianos del parásito podría estar implicado en el amplio espectro clínico de presentación de la enfermedad de Chagas en Colombia.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, RAPD, RFLP, histona H2A, isoenzimas, polimorfismo.

Genetic variability in six Colombian *Trypanosoma cruzi* strains detected by restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Chagas disease, caused by the hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, is a public health problem in Colombia. Previous reports have indicated the presence of heterogeneity among parasite populations. Six Colombian *T. cruzi* strains were obtained that differed by host, geographical region and transmission cycle. The genetic variability of each was compared by random amplified polymorphic DNA (RAPD), and isoenzymes. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) was extracted using the 1.2 kb unit encoding the parasite's H2A histone as a probe. Genetic distances between the isolates varied greatly, from 0.611 to 0.99 as determined by RAPD profiles (M13F and M13R primers), between 0 and 0.81 by RFLP profiles (5 endonucleases), and between 0.10 and 0.55 by isoenzymes (13 enzymatic systems). Genetic distance matrixes derived from each of the three methods showed that Colombian strains exhibit a high degree of genetic differentiation. This may account for the broad clinical spectrum of Chagas disease in Colombia.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, RAPD, RFLP, histone H2A, isoenzymes, polymorphism.

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, enfermedad altamente prevalente en países tropicales y subtropicales de Latinoamérica, en donde afecta a más de 20 millones de personas, en tanto que otros 90 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección (1).

T. cruzi es un parásito altamente pleomórfico con un complejo ciclo de vida que infecta un amplio rango de especies mamíferas domésticas y silvestres, las cuales constituyen reservorios del mismo. Los parásitos son transmitidos por varias especies de insectos triatómicos y los síntomas y severidad de la enfermedad varían en distintas regiones geográficas, desde una infección asintomática hasta cardiomiopatías y mega-síndromes intestinales (2-4).

En Colombia, esta enfermedad se caracteriza por tener una presentación variable con un amplio espectro clínico que abarca tanto pacientes infectados asintomáticos que no desarrollan la enfermedad (estado I), como pacientes que únicamente desarrollan una sintomatología leve compatible con el estado II y pacientes que presentan falla cardíaca y muerte súbita secundaria a una cardiomiopatía dilatada (estado III) (5).

Esta variabilidad en la presentación clínica de la enfermedad puede deberse tanto a la diversidad genética de la población humana comprometida, como a la heterogeneidad presentada por las diferentes cepas del parásito (2,6).

Es así como los estudios de isoenzimas (3,7,8), esquizodemas (9,10), cariotipos (6,11,12), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLP) (11,12) y, más recientemente, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (13,14) han demostrado la diversidad fenotípica y genotípica de *T. cruzi*.

Correspondencia:

Concepción Puerta: Carrera 7 N° 43-82, Laboratorio 124, Bogotá, D.C., Colombia; teléfono: (571) 320 8320, extensión 4138; fax: (571) 320 8320, extensión 4021; cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 20/12/01; aceptado: 27/08/02

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron variabilidad isoenzimática en siete cepas colombianas de *T. cruzi*, con un máximo de cuatro alelos diferentes por locus (15). En este trabajo se extendió dicho estudio de variabilidad al análisis de polimorfismo del ADN usando las técnicas de RAPD y RFLP y comparando los hallazgos obtenidos con los resultados del análisis isoenzimático.

Materiales y métodos

Parásitos

El origen y las características de las cepas utilizadas se muestran en el cuadro 1. Todas las cepas estudiadas habían sido caracterizadas previamente por isoenzimas y correspondieron al zimodema I (15). Los epimastigotes se cultivaron en medio REI modificado, suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF) y 100 mg/ml de gentamicina a 24 °C. Como cepa de referencia se empleó la cepa Y de Río de Janeiro (Brasil), aislada de humano por xenodiagnóstico, perteneciente al zimodema ZII (16).

Ensayos de RAPD

El ADN de los parásitos se extrajo según lo indicado por Escalante *et al.* (17). Su pureza, integridad y concentración se aseguraron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm (18).

Se utilizaron como iniciadores los oligonucleótidos universales *M13 forward* (M13F): 5'-d(GTTTTCCAGTCACGAC)-3' y *M13 reverse* (M13R): 5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía: Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM, KCl, 50 mM, MgCl₂, 1,5 mM, dGTP, dATP, dTTP y dCTP, 200 µM cada uno y Taq ADN polimerasa (Promega), 2,5 unidades. El oligonucleótido se adicionó a una concentración de 6,4 pmoles y se ensayaron cantidades variables de ADN: 1, 5, 10 y 20 ng. Como control se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin ADN. La reacción anterior se llevó a un termociclador (Perkin Elmer) y se sometió, en primer lugar, a un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido por dos ciclos,

con el siguiente perfil de temperaturas: 95 °C durante 30 segundos para desnaturalización; 30 °C durante 2 minutos para anillaje y 72 °C durante 1 minuto para extensión. Posteriormente, la reacción se sometió a 33 ciclos, durante los cuales la temperatura de anillaje se incrementó a 40 °C. En el último ciclo, la extensión se aumentó a 5 minutos. A continuación, una alícuota de 5 µl de la reacción anterior se analizó mediante geles de agarosa al 1,6%, teñidos con bromuro de etidio (18). Los geles se fotografiaron y se determinó la presencia de las bandas en cada una de las cepas con base en su resolución, intensidad y reproducibilidad en reacciones de amplificación separadas (19). El porcentaje de bandas comunes entre las cepas se definió según la siguiente fórmula: $\% (p) = 100 \text{ nab} / (\text{na} + \text{nb})$, donde (na) y (nb) representan el número de bandas en cada una de las cepas a y b; (nab) corresponde al número de bandas compartidas entre (a) y (b).

Ensayos de RFLP

Dos µg de ADN de los parásitos fueron digeridos con ocho enzimas de restricción: *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Not*I, *Sal*I y *Sty*I, según las condiciones especificadas por la casa comercial fabricante (Gibco-BRL). La totalidad de la digestión se aseguró por rehibridación de las membranas con el gen codificante para 1F8 de *T. cruzi* (20). Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% y se transfirieron a membranas de nylon (Magnagraph MSI, Fisher), siguiendo el protocolo de transferencia salina (21). A continuación, las membranas fueron prehibridadas a 42 °C durante 2 horas en una solución de formamida 50%, Na₂HPO₄ (pH 7,2), 0,12 M, NaCl 0,25 M, SDS 7%, EDTA 1 mM, y 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado. La hibridación se realizó durante toda la noche a 42 °C, usando como sonda el inserto del clon pBSTcH2A1, correspondiente a la unidad de 1,2 kb de la histona H2A de *T. cruzi* (22) marcado con biotina, según las indicaciones de la casa fabricante (Gibco-BRL). Posteriormente, los filtros se enjuagaron brevemente en SSC 2X (solución salina citrato 1X: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0) y lavados durante 15 minutos

con SSC 1X, SDS 0,5% a 42 °C; SSC 0,5X, SDS 0,5% a 50 °C y SSC 0,1X, SDS 0,5% a 65 °C.

A continuación, las señales se detectaron con el conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (GIBCO-BRL) y reveladas con el sustrato cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato disódico (BCIP) (Gibco-BRL), según las indicaciones de la casa fabricante.

Análisis de datos

Los análisis de variabilidad se basaron en los loci de la histona H2A (RFLP) y dos cebadores (RAPD), teniendo en cuenta solamente la presencia o ausencia de los fragmentos reproducibles e inequívocos obtenidos con cada uno de los dos métodos. Las matrices de distancia genética entre las diferentes cepas se generaron utilizando la distancia de Jaccard definida como $D = 1 - [C / (2N - C)]$, donde C es el número de bandas en común entre dos cepas y N es el número total de bandas diferentes (23). Adicionalmente, los resultados de isoenzimas obtenidos previamente (15) se analizaron según la distancia de Manhattan, teniendo en cuenta solamente las cepas incluidas en este estudio. La agrupación de los datos se realizó según el método jerárquico UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) con el programa NTSYSpc versión 2.02 (24).

Resultados

Perfiles de RAPD

Se seleccionaron 52 bandas obtenidas con ambos iniciadores con base en su resolución, intensidad y reproducibilidad en reacciones de amplificación separadas.

Dichas bandas, ubicadas dentro de un rango de peso molecular de 300 a 4.000 pb, se codificaron con letras mayúsculas y se tabularon (cuadro 1). Tal como se muestra en la figura 1, los iniciadores generaron patrones polimórficos para un total de 14 RAPDemos y se obtuvo una diversidad genética de $6/6 = 1$ por iniciador.

Por otra parte, el análisis de bandas amplificadas compartidas mostró que con ambos iniciadores las cepas colombianas del parásito comparten alrededor de un 13% de los fragmentos

Cuadro 1. Características de las cepas de *Trypanosoma cruzi* estudiadas y de sus respectivos fragmentos de ADN amplificados mediante RAPD.

Cepas y código	Procedencia	Origen	M13F	M13R
No. 3 (MDID/CO/87)	Zulia, Norte Santander	<i>Didelphis marsupialis</i> (fara), silvestre	CEGIÑSUVWYZ	DFIOQS
Ikiakarora (IRHO/CO/95)	Catatumbo, Norte Santander	<i>Rhodnius prolixus</i> , silvestre	BDHJLLNQTVW YZ	DHJKMPS
Shubacbarina (IRHO/CO/95)	Catatumbo, Norte Santander	<i>Rhodnius prolixus</i> , silvestre	CGIÑSUXYZ	DFHILOR
M. Rangel (MHOM/CO/86)	Chiriguaná, Cesar	Humano, domiciliario	LZ	V
B.M. López (MHOM/CO/87)	Paratebuena, Cundinamarca	Humano, domiciliario	BGIOSUWYZ	ABCDEFGHIILLMNÑOSTU
Munanta (IRHO/CO/85)	Guateque, Boyacá	<i>Rhodnius prolixus</i> , domiciliario	DFKPS	-
Y (MHOM/BR/00/Y)	Rio de Janeiro, Brasil	Humano	ALMR	BEI

Las letras mayúsculas representan los fragmentos amplificados con el iniciador M13 *forward* y M13 reverso.

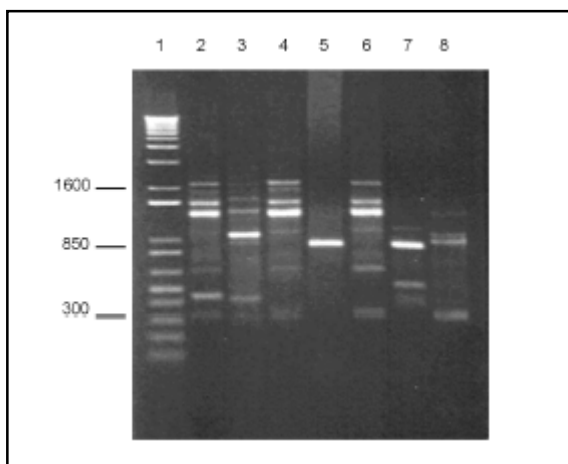


Figura 1. Perfiles de RAPD con el uso del oligonucleótido M13 *forward*. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1,6%, coloreado con bromuro de etidio. Carriles: 1) patrón de peso molecular 1 kb (Gibco-BRL), cuyos fragmentos se indican en pb; 2) No. 3 (MDID/CO/87); 3) Ikiakarora (IRHO/CO/95); 4) Shubacbarina (IRHO/CO/95); 5) M. Rangel (MHOM/CO/86); 6) B.M. López (MHOM/CO/87); 7) Munantá (IRHO/CO/85), y 8) Y (MHOM/BR/00/Y).

amplificados, mientras que al comparar las cepas colombianas con la brasileña Y, dicho porcentaje se reduce a un 10%.

Patrones de RFLP

De las ocho enzimas de restricción analizadas, se encontró que con dos de ellas, *Bam*HI y *Bst*EII,

hay diferencias en el tipo de unidades H2A generadas. La enzima *Bam*HI libera dos unidades de 1,2 y 0,7 kb en la cepa Ikiakarora, mientras no liberó ninguna en el resto de las cepas analizadas y solamente liberó la unidad de 1,2 kb en la cepa del Brasil. Por su parte, la enzima *Bst*EII liberó las dos unidades en las cepas M. Rangel e Ikiakarora y solamente la unidad de 1,2 kb en las cepas B.M. López, No. 3 y Y Brasil. Adicionalmente, con la mayoría de la endonucleasas que tienen sitio de corte dentro de las unidades, tal como *Bst*EII (figura 2a), *Kpn*I, *Bam*HI y *Sty*I, se detectó la presencia de bandas múltiples de las unidades de repetición, correspondientes a polimorfismo en la secuencia entre las unidades de una misma cepa. Por otra parte, la enzima *Eco*RI no corta dentro de las unidades, pero genera un patrón polimórfico con bandas de alto peso molecular (figura 2b) que contribuye a la variabilidad detectada en estas cepas. Es así como, finalmente, se obtuvieron 6 RFLDemos, para una diversidad genética de $6/7=0,85$, la cual es ligeramente menor de la obtenida con el uso de los RAPD como marcador.

Análisis de la variabilidad

La variabilidad o polimorfismo del ADN entre las cepas se analizó mediante la construcción de dendogramas individuales basados en la

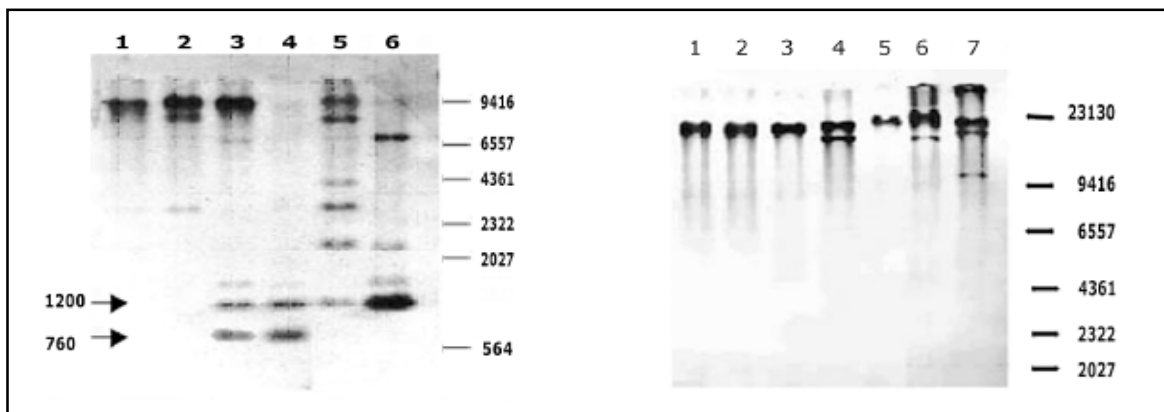


Figura 2. Patrones de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción después de la digestión con a) *BstEII* y b) *EcoRI*. **2a.** Carriles: 2 μ g de ADN de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas: 1) Shubacbarina (IRHO/CO/95), 2) Munantá (IRHO/CO/85), 3) M. Rangel (MHOM/CO/86), 4) Ikiakarora (IRHO/CO/95), 5) No. 3 (MDID/CO/87) y 6) B.M. López (MHOM/CO/87) fueron digeridos con la enzima *BstEII* e hibridados con la unidad 1,2 kb codificante para la histona H2A de dicho parásito, marcada con biotina. **2b.** Carriles: 2 μ g de ADN de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas: 1) Y (MHOM/BR/00/Y), 2) Shubacbarina (IRHO/CO/95), 3) Munantá (IRHO/CO/85), 4) M. Rangel (MHOM/CO/86), 5) Ikiakarora (IRHO/CO/95), 6) No. 3 (MDID/CO/87) y 7) B.M. López (MHOM/CO/87) fueron digeridos con la enzima *EcoRI* e hibridados con la unidad 1,2 kb codificante para la histona H2A de dicho parásito, marcada con biotina. A la derecha se indican los tamaños en pb de los fragmentos *HindIII* del fago λ gt11.

distancia genética de Jaccard para los estudios de RAPD y RFLP y la distancia de Manhattan para las isoenzimas. Llamativamente, el análisis de RAPD muestra una gran heterogeneidad entre todas las cepas colombianas del parásito, con una distancia de Jaccard mínima de 0,6071 y máxima de 0,99, siendo las cepas Shubacbarina, No. 3 y B. M. López las más cercanas (figura 3a). Por su parte, cuando se analiza el dendrograma obtenido con los RFLP, se encuentra nuevamente que las cepas colombianas varían entre sí con una distancia de Jaccard mínima de cero y máxima de 0,81, siendo las cepas Munantá y Shubacbarina las más cercanas, seguidas de M. Rangel, B. M. López y No.3 (figura 3b). Finalmente, el análisis de isoenzimas también mostró variabilidad entre las cepas colombianas, pero con distancias genéticas menores entre ellas, las cuales se sitúan en un rango de 0,1 a 0,55 (figura 3c).

Adicionalmente, vale la pena destacar que si bien la asociación entre las cepas Shubacbarina, B. M. López y No.3 se mantuvo en los tres dendrogramas, la topología de los mismos varió. Por ejemplo, la primera agrupación en el análisis de isoenzimas mostró a M. Rangel separada del resto de cepas, mientras que en el análisis de

RAPD la primera agrupación separó a la cepa Munantá del resto del grupo y por RFLP fueron las cepas Y e Ikiakarora las que primero se separaron del grupo en general.

Discusión

En este trabajo se realizó un análisis de variabilidad de seis cepas colombianas de *T. cruzi* mediante RAPD (cebadores M13F y M13R) y RFLP (gen de la histona H2A, unidades de 1,2 y 0,76 kb, endonucleasas: *EcoRI*, *BamHI*, *KpnI*, *BstEII* y *StyI*), como ampliación de un estudio previo de isoenzimas (15). Si bien Saravia *et al.* (25), Márquez *et al.* (26) y Ruiz *et al.* (27), entre otros, han estudiado la variabilidad genética de un mayor número de cepas colombianas, estos estudios se han centrado en el análisis de los patrones isoenzimáticos, metodología superada por el RAPD para la determinación de polimorfismo y correlación con el comportamiento biológico de cepas del parásito (28).

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian cómo, en primer lugar, las cepas colombianas exhibieron un elevado grado de heterogeneidad entre ellas y, en segundo lugar, que las distancias genéticas entre ellas variaron según el método de análisis empleado. Estos

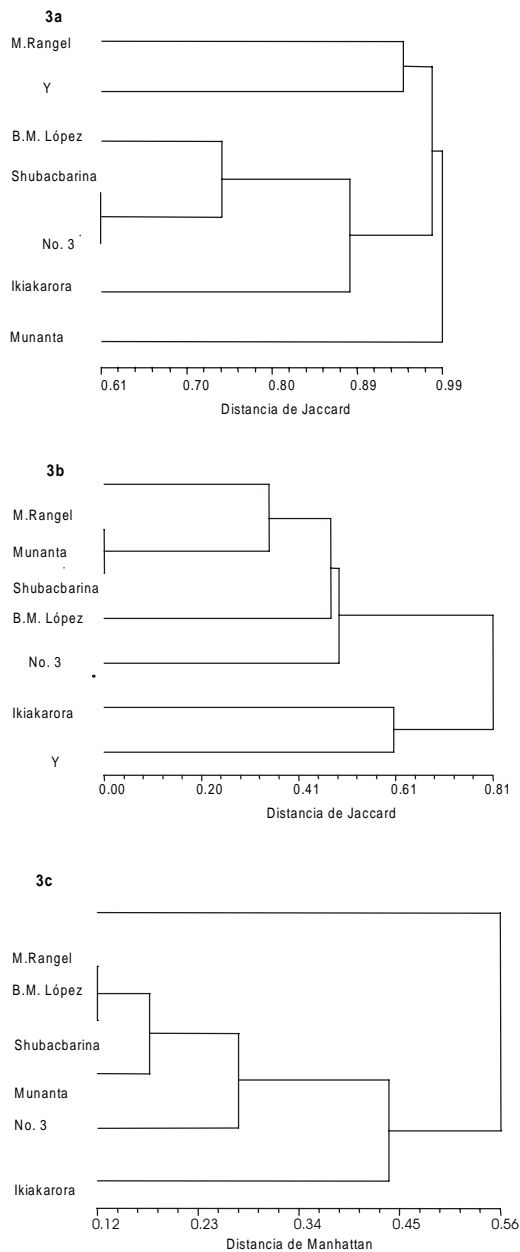


Figura 3. Dendogramas obtenidos según los perfiles de a) RAPD, b) RFLP y c) isoenzimas. **3a.** Dendograma basado en la distancia genética de Jaccard, obtenida según los perfiles de RAPD y agrupadas según el programa UPMGA/NTSYS. **3b.** Dendograma basado en la distancia genética de Jaccard, obtenida según los perfiles de RFLP y agrupadas según el programa UPMGA/NTSYS. **3c.** Dendograma basado en la distancia genética de Manhattan, obtenida según los perfiles de isoenzimas y agrupadas según el programa UPMGA/NTSYS.

resultados sugieren que el comportamiento del parásito en Colombia difiere del de los otros países de Suramérica, especialmente de los países del Cono Sur, en donde diferentes estudios muestran correlación entre los resultados de isoenzimas y los de RAPD (13,14,29-31). Adicionalmente, vale la pena resaltar cómo si bien todas las cepas analizadas pertenecen al zimodema ZI, no se presentaron perfiles de RAPD iguales entre ellas, lo cual indica que su heterogeneidad es muy alta, a diferencia de los estudios de Brisse *et al.* (32) y Bosseno *et al.* (33), quienes informaron un alto grado de homogeneidad entre los RAPD de cepas pertenecientes al zimodema I.

El elevado grado de polimorfismo exhibido por las cepas colombianas de *T. cruzi*, en comparación con las cepas de otros países, se puede deber tanto a las condiciones geográficas y topológicas específicas del país, como a la presencia simultánea de los ciclos de transmisión doméstico y selvático en el país y a las diferencias dictadas por las características genéticas de los hospederos, reservorios y vectores a partir de los cuales fueron aisladas, que podrían seleccionar poblaciones del parásito (34). A este respecto, es importante anotar cómo varios estudios de RAPD indican variabilidad genética tanto entre los vectores transmisores de la enfermedad en el norte del Brasil (35) como entre los vectores *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis* en Colombia (36).

Por otra parte, teniendo en cuenta los informes previos de estructura clonal del parásito, tanto para cepas oriundas de otros países de Latinoamérica (8,14) como para las de Colombia (26,27), las discrepancias entre los diferentes métodos de análisis empleados se pueden enmarcar dentro de una o varias de las siguientes situaciones: 1) los marcadores analizados poseen diferentes tasas de mutación entre ellos; por ejemplo, para el caso de las histonas, se conoce que estos genes son altamente conservados a lo largo de la escala filogenética (37), o 2) alguno de los marcadores puede estar sometido a presiones selectivas, como puede ser el caso de las isoenzimas (38). Sin embargo, tampoco se puede descartar la recombinación genética entre

poblaciones naturales del parásito, tal como lo indican los trabajos de Carrasco *et al.* (29) y Stothard *et al.* (39).

Adicionalmente, vale la pena destacar cómo la presencia de variabilidad entre las cepas colombianas del parásito se evidencia de manera más contundente con el estudio de RAPD (cuadro 1, figura 1). De acuerdo con lo anterior, cuando se analizó el porcentaje de bandas compartidas en el RAPD entre las cepas colombianas se obtuvo un porcentaje muy bajo, (13%), si se tienen en cuenta los datos previos de 74% de Duarte *et al.* (30) y de 60% de Steindel *et al.* (13) para cepas brasileñas pertenecientes al zimodema ZI, hecho que igualmente destaca la elevada heterogeneidad de las cepas colombianas en comparación con cepas de otros países.

Por otra parte, tal como se ha descrito para la mayoría de los genes repetidos en tándem de tripanosomátidos, los ensayos de RFLP muestran que los genes codificantes para la histona H2A de *T. cruzi* presentan polimorfismo en su secuencia de nucleótidos. Las variaciones encontradas se centran en las regiones intergénicas de las unidades y, por tanto, no afectan el producto proteico codificado. Adicionalmente, vale la pena resaltar la presencia de bandas múltiples de las unidades de 1,2 y 0,7 kb en los patrones obtenidos con algunas de las enzimas, las cuales corresponden a polimorfismos entre las unidades dentro de una misma cepa, variaciones intra-individuo que también han sido descritas en los genes codificantes para las histonas de eucariotes superiores (37). Este elevado polimorfismo en las histonas llama la atención, por cuanto estas proteínas se conservan altamente a lo largo de la escala evolutiva.

Finalmente, teniendo en cuenta que los genes codificantes para la histona H2A de *T. cruzi* también varían en el número de copias relativas de las unidades, en la expresión y en la organización cromosómica (40), se sugiere que la plasticidad de estos genes puede obedecer a un proceso evolutivo lento, en el cual se han acumulado mutaciones puntuales al azar, combinado con rearrreglos cromosomales gruesos.

En conclusión, se confirma que las cepas colombianas de *T. cruzi*, aisladas de diferentes hospederos y regiones geográficas, son variantes genotípicas que podrían estar relacionadas con el espectro de las presentaciones clínicas de la enfermedad de Chagas en Colombia. A este respecto, es importante tener en cuenta los estudios de Andrade *et al.* (41) quienes encontraron que dos poblaciones del parásito, JG y Coll.7G2, con perfiles diferentes de la reacción en cadena de la polimerasa de baja astringencia varían en su distribución tisular y patogenicidad en ratones crónicamente infectados. Igualmente, de Lana *et al.* (42) informaron que los genotipos clonales de *T. cruzi* difieren significativamente en su infectividad en ratones, demostrándose así, en los dos estudios, una asociación entre diversidad genotípica, tropismo y patogenicidad del parásito.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente por el Fondo para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República de Colombia, contrato No. 960006.

Referencias

1. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos No.811. Ginebra: OMS; 1991.
2. **Dvorak JA.** The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* 1984;24:357-71.
3. **Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Povoá M.** Further enzymatic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:221-7.
4. **Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Withner M.** Chagas disease. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:400-9.
5. **Rosas F.** Cardiomiopatía de Chagas en Colombia. En: Vallejo GA, Carranza JC, Jaramillo JC, editores. *Memorias del Curso Taller Internacional de Biología, Epidemiología y Control de la Tripanosomiasis Americana y Leishmaniasis*. Ibagué: LITO-Ediciones; 2000. p.11-8.
6. **Henriksson J, Pettersson U, Solari A.** *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp Parasitol* 1993;77:334-8.

7. **Miles MA.** The epidemiology of South American trypanosomiasis: biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:5-23.
8. **Tibayrenc M, Ayala FJ.** Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988;42:277-92.
9. **Alves AM, De Almeida DF, von Kruger WM.** Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles induced by environmental conditions and subcloning. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41:415-9.
10. **Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L.** Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1990;42:175-88.
11. **Wagner W, So M.** Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immun* 1990;58:3217-24.
12. **Dos Santos WG, Buck GA.** Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:17-23.
13. **Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ.** Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:71-9.
14. **Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ.** Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1335-9.
15. **Rodríguez P, Montilla M, Nicholls RS, Zarante I, Puerta C.** Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:739-40.
16. **Silva LH, Nussensweig V.** Sobre uma cepa altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 1953;20:191-207.
17. **Escalante M, Montilla M, Nicholls RS, Del Portillo P, Puerta CJ.** Extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante tratamiento con bromuro de hexadecil-trimetilamonio. *Biomédica* 1997;17:120-5.
18. **Sambroock J, Maniatis T, Fritsch E.** Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p:6.2-6.19.
19. **Stevens JR, Tibayrenc M.** Detection of linkage disequilibrium in *Trypanosoma brucei* isolated from tsetse flies and characterized by RAPD analysis and isoenzymes. *Parasitol* 1995;110:181-6.
20. **Gonzalez A, Lerner TJ, Huecas M, Sosa Pineda B, Nogueira N, Lizardi PM.** Apparent generations of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 1985;13:5789-804.
21. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-7.
22. **Puerta C, Martin J, Alonso C, López MC.** Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64:1-10.
23. **Jaccard P.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat* 1908;44:223-70.
24. **Sokal RR, Sneath, PH.** Principles of numerical taxonomy. San Francisco (CA): W.H. Freeman and Company; 1973. p.537.
25. **Saravia NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A.** Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:59-69.
26. **Marquez E, Arcos-Burgos M, Triana O, Moreno J, Jaramillo N.** Clonal population structure of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1998;84:1143-9.
27. **Ruiz M, Montilla M, Nicholls RS, Angarita L, Alvarez D.** Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. *Heredity* 2000;85:318-27.
28. **Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gomez-Barrio A.** Relationship between biological behaviour and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem Inst Osw Cruz* 2001;96:251-6.
29. **Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA.** Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:418-24.
30. **Duarte C, Fonseca SM, Penna I, Percival L, Vidigal PG, Steindel M, et al.** Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:343-51.
31. **Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ.** Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998;93:203-14.
32. **Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:95-105.
33. **Bosseno MF, Barnabe C, Magallon E, Lozano F, Ramsey J, Espinoza B, et al.** Predominance of

- Trypanosoma cruzi* lineage I en Mexico. J Clin Microbiol 2002;40:627-32.
34. **De Luca-D'Oro GM, Gardenal CN, Perret B, Crisci JV, Montamat EE.** Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. Parasitology 1993;107:405-10.
 35. **Borges EC, Romanha AJ, Diotaiuti L.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in the populational study of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. Cad Saúde Publica 2000;16:97-100.
 36. **Jaramillo C, Montana MF, Castro LR, Vallejo GA, Guhl F.** Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. Mem Inst Osw Cruz 2001;96:1043-8.
 37. **Maxson R, Cohn R, Kedes L, Mohun T.** Expression and organization of histone genes. Ann Rev Genet 1983;17:239-77.
 38. **Alves AM, Tanuri A, De Almeida DF, von Kruger WM.** Reversible changes in the isoenzyme electro-phoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol 1993;77:246-53.
 39. **Stothard JR, Frame IA, Miles MA.** Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: Dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants. Mem Inst Osw Cruz 1999;94:189-93.
 40. **Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls S, et al.** Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 2000;75:203-10.
 41. **Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM.** Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol 1999;100:163-72.
 42. **de Lana M, da Silveira Pinto A, Bastrenta B, Barnabe C, Noel S, Tibayrenc M.** *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. Exp Parasitol 2000;96:61-6.