



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN HISTOTRÓPICA Y GENÉTICA
MEDIANTE LSSP-PCR DE AISLADOS RECIENTES DE
Trypanosoma cruzi DE VENEZUELA.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller Lucelia Briceño como
requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutores: Dra. Clara Martínez
Dra. Concepción Hernández

CARACAS, VENEZUELA

Octubre – 2009

Dedicatoria

Este logro quiero dedicárselo a dos seres que han colmado mi vida de bendiciones, experiencias inolvidables que me han dado la energía y el incentivo necesario para recorrer este largo camino repleto de aciertos y desaciertos que han dejado en mi día a día aprendizajes y ganas de seguir luchando por un mejor futuro.

A ti mamá que has dado lo mejor de ti para acompañarme a construir mi futuro, que me has demostrado que con mucho esfuerzo y sacrificio se logran las cosas y que todo en esta vida hay que hacerlo bien o sino es mejor no hacer nada. Este triunfo es tan tuyo como mío y hoy mas que nunca quiero que sepas que eres mi mayor orgullo.

A ti mi viejita hermosa, que me regalaste tantos momentos especiales y siempre estuviste allí con los brazos abiertos esperándome para consentirme y apoyarme en todo lo que me proponía realizar y, aunque tu partida me dolió en el alma se que donde quiera que te encuentres estas feliz compartiendo conmigo esta alegría de haber alcanzado esta meta, nuestra meta porque me dijiste que siempre estarías a mi lado para verme convertida en toda una profesional.

Este triunfo es para ustedes y por ustedes, las amo y que Dios me las bendiga siempre...

Agradecimientos

En primer lugar a Dios por haberme puesto en el camino y lugar correcto para vivir esta gran experiencia al lado de personas maravillosas que me dejaron aprendizajes y trabajaron arduamente en el desarrollo de mi vida profesional, a todas ellas GRACIAS por haber estado, por estar y porque seguirán estando conmigo a lo largo de mi vida..

A mis padres y mi hermana por apoyarme en todo momento y estar conmigo en cada peldaño que me tocó subir para llegar a esta etapa, en especial a ti mami gracias por la paciencia, por el cariño y por todas las comidas que me preparaste para que mi estadía en la universidad fuera más agradable. LOS AMO...

A mi familia en especial mis tíos María, Carmen, Juana, Domingo, Yaya y José Luis que me dieron el impulso inicial para que continuara con mi desarrollo profesional y nunca me han dejado sola en este largo, pero enriquecedor camino.

A ti Alejandro mil gracias por la paciencia, la compañía, la sabiduría y por demostrarme que a pesar de las dificultades si se puede salir adelante si uno se lo propone. Te Admiro profundamente y sobretodo gracias por toda la alegría que me regalas y me has regalado en los momentos cruciales de mi vida. TE QUIERO MUCHISIMO...

A mis grandes amigos que afortunadamente lograron sobrevivir a mi personalidad durante la carrera... Gracias a Ana (Mi Amiga), María de los Ángeles (Mari-Mari), Rubén (Las Caraotas), Andrea (La Mojigata), Esmeralda (La Negra), Miguel (El Negrito), Arturo (Gruñoz), Daniela (La Capocha), Floritza (La Jefa), Sra. Marisa (Mi mamá adoptiva), Nigmat (Nisma). Cada uno de ustedes ha dejado en mi mente y mi corazón infinidad de recuerdos repletos de risas, lágrimas y comelonas pero sobretodo gracias por confirmarme que la amistad existe y más si ustedes están presentes. GRACIAS A TODOS, SE LES QUIERE MUCHO.

A todos mis profesores que tuvieron la difícil tarea de enseñarme los conocimientos necesarios en mi desarrollo académico. En especial quiero agradecer a mi tutora la prof. Clara Martínez quien tuvo una enorme paciencia conmigo y sobretodo con mi carácter, y que además me ha apoyado a largo de los últimos cuatro años y es la que pone el toque de calma que se necesita en los momentos de presión. La prof. Leidi también ha sido una persona fundamental en mi formación y además me ha brindado su apoyo y colaboración en todo momento. Finalmente el prof. Hernán que siempre colaboró en el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de trabajo, que mas que compañeros son como mi otra familia porque con ellos he compartido gran parte de mi tiempo, además me han enseñando muchos de los conocimientos que ahora poseo. Gracias Kelly, Anaibeth, Tomás, Cristina, Anny, Denisse, Nilsa, Meme, Karina, Glenda y por supuesto a ti mi madre querida Marlenes Rodríguez que has sido un ángel que Dios me puso en el camino para darme cariño, regaños, consejos y toda su experiencia que fue clave en este proyecto, pero sobretodo gracias por enseñarme que a pesar de los problemas siempre hay tiempo para sonreír y ser feliz.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	pp.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Índice General.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Financiamiento.....	xi
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	8
2.1.- Modelo Histotrópico Clonal.....	8
2.2.- Virulencia.....	13
3.- OBJETIVOS.....	16
3.1.- Objetivo General.....	16
3.2.- Objetivos Específicos.....	16
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1.- Origen de los Parásitos.....	17
4.2.- Cultivo de Parásitos.....	17
4.3.- Modelos Murinos.....	18
4.4.- Infecciones Experimentales.....	18
4.5.- Evaluación de la Virulencia.....	20
4.6.- Necropsia.....	20
4.7.- Aislamiento de ADN de tejidos infectados.....	21
4.8.- Detección de ADN de <i>T. cruzi</i> mediante PCR.....	22
4.9.- Amplificación de la región variable del minicírculo k-ADN por LSSP-PCR.....	24
4.10.- Análisis de los patrones de amplificación.....	25

4.11.- Aspectos Bioéticos.....	26
5.- RESULTADOS	
5.1.- Curvas de Parasitemia y de Supervivencia.....	27
5.2.- Necropsia de los ratones y análisis histológico de los tejidos.....	34
5.3.- Análisis Moleculares.....	40
5.4.- Análisis de Diversidad Genética.....	50
6.- DISCUSIÓN.....	53
7.- CONCLUSIONES.....	65
8.- RECOMENDACIONES.....	66
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	pp.
1.- Distribución geográfica de países endémicos de la Tripanosomiasis Americana en el año 2009.....	1
2.- Modelo Histotrópico de la Enfermedad de Chagas.....	9
3.- Curva de Parasitemia del aislado X10462 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones isogénicos C3H/He.....	28
4.- Curva de Parasitemia del aislado X10462 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.....	29
5.- Curva de Parasitemia del aislado X12422 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.....	30
6.- Curva de Parasitemia del aislado PJRP109 proveniente de un vector colectado en una zona endémica del Estado Portuguesa, en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.....	31
7.- Curva de Supervivencia de ratones experimentales C3H/He e IMT inoculados X10462 y X12422 y con el aislado PJRP109 en ratones IMT.....	32
8.- Parasitismo tisular en ratones C3H/He infectados experimentalmente con un aislado de <i>T. cruzi</i> (X10462).....	35
9.- Parasitismo tisular en ratones IMT infectados experimentalmente con un aislado de <i>T. cruzi</i> (X12422).....	37
10.- Parasitismo tisular en ratones IMT infectados experimentalmente con un aislado de <i>T. cruzi</i> (PJRP109).....	39
11.- Identificación de los tejidos infectados de ratones infectados experimentalmente mediante PCR del aislado de <i>T. cruzi</i> X10462.....	40
12.- Identificación de los tejidos provenientes de ratones infectados experimentalmente, mediante PCR del aislado de <i>T. cruzi</i> X12422.....	41

13.- Identificación de los tejidos infectados de ratones infectados experimentalmente mediante PCR del aislado de <i>T. cruzi</i> PJRP109.....	42
14.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en el PPP.....	43
15.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en la fase aguda	44
16.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en el DMP.....	45
17.- Perfil electroforético generado mediante por LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X12422.....	46
18.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado X12422.....	47
19.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en el PPP.	48
20.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en la fase aguda	49
21.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en el último sacrificio.....	49
22.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de X12422 inoculados en ratones C3H/He.....	50
23.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de X12422 inoculados	

en ratones IMT.....	50
24.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de X12422 inoculados en ratones C3H- IMT.....	51
25.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de PJRP109 inoculados en ratones IMT en la fase aguda	51
26.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de PJRP109 inoculados en ratones IMT en el último sacrificio	52
27.- Representación de los procesos que inducen la reducción de la complejidad de cepas multiclonales en la Enfermedad de Chagas.....	58

FINACIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado por los Proyectos de Grupo:

- FONACIT G-2005000827.
- CDCH N° 09-00-5632-2004.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas (Chagas, 1909) es una enzootia que se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, incluyendo algunos países de las Antillas (ver figura 1). Esta parasitosis, es considerada como un problema de salud pública, ya que se estima que existen cerca de 16-18 millones de personas infectadas en el continente americano (WHO, 2002).



Figura 1.- Distribución geográfica de países endémicos de la Tripanosomiasis Americana en el año 2009.

(Modificado de: http://www.dndi.org.br/Imagens/mapa_doenca_chagas.jpg).

[Consulta: 16 de Septiembre de 2009]

Esta parasitosis es causada por el hemoflagelado, heteroxénico *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), el cual es transmitido por insectos hematófagos que actúan como vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), los cuales vehiculan las formas infectantes o metacíclicos, a través de las heces, afectando exclusivamente a mamíferos. Sin embargo se ha descubierto que existen otras vías de infección, tales como: transfusión sanguínea, vía transplacentaria, y formas menos frecuentes como lo son trasplantes de órganos, ingestión de alimentos contaminados y accidentes de laboratorio (WHO, 1991; Pinto Dias, 2000).

El *Trypanosoma cruzi* infecta a más de 100 especies de mamíferos entre domésticos y silvestres de diferentes órdenes (Lambrecht, 1965; Zeledon y Rabinovich, 1981). La enfermedad de Chagas como se define el parasitismo en el humano, es un hecho puramente accidental; en la medida que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatominos infectados a ocupar viviendas humanas, que le han brindado al vector, refugio y alimento (sangre humana y de otros animales domésticos y sinantrópicos). De esta manera, entra el hombre a formar parte activa de la cadena epidemiológica (WHO, 2002).

El curso clínico de la enfermedad es variable y las manifestaciones identificadas en los pacientes van desde casos asintomáticos; casos agudos con elevada parasitemia y miocarditis aguda causada por la invasión de las fibras

cardíacas por tripomastigotes, hasta casos crónicos graves que pueden involucrar problemas cardíacos, gastrointestinales megacolon o megaesófago o ambos (Tanowitz y col., 1992; Andrade y col., 1994). La enfermedad crónica tiene manifestaciones marcadamente diferentes dependiendo del área geográfica, los megasíndromes son comunes en la región central de Brasil y en la región sur de Suramérica, pero son raros o ausentes en la región norte de Suramérica y en Centroamérica (WHO, 2002). La causa de la variabilidad en prevalencia, severidad y patogenicidad de las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas aún no se conoce.

Esta particular distribución geográfica de la enfermedad de Chagas, así como la variabilidad de respuesta de los pacientes al tratamiento y el comportamiento del parásito en triatominos y mamíferos han conducido a estudiar el comportamiento biológico y la estructura genética del parásito. Se han desarrollado estudios multidisciplinarios que involucran tópicos como biología, bioquímica, inmunología y genética que han permitido la caracterización de diferentes aislados de *T. cruzi*, demostrando que existe heterogeneidad en las sub-poblaciones que circulan entre vectores, humanos y reservorios tanto domésticos como silvestres. Hecho que se ha evidenciado al aislar el parásito de diversos hospederos, observándose una gran variación intraespecífica en cuanto a pleomorfismo, virulencia, capacidad de causar lesiones, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y tropismo tisular (Brenner, 1985).

Los trabajos pioneros de Miles y col. (1977) introdujeron la técnica de electroforesis de enzimas isofuncionales, cuyo resultados mostró que a pesar de lo variable de los perfiles electroforéticos generados por las isoenzimas, de aislados de *T. cruzi* que provenían de distintas zonas rurales endémicas y de diferentes fuentes (vector, reservorio y humano), era posible asociarlos a dos grupos. Uno derivado de animales selváticos y triatomínicos (Grupo de cepas 1) y el otro derivado de humanos y animales domésticos infectados (Grupos de cepas 2). Un tercer grupo fue caracterizado posteriormente y denominado Zimodemo 3, el cual estaba asociado también al ciclo de transmisión selvático, y se encontraban infectando armadillos, marsupiales, triatomínicos y raramente humanos, demostrando con ello la existencia de tres grupos filogenéticos denominados zimodemos (Z1, Z2 y Z3), que adicionalmente se segregaban de acuerdo con las características ambientales y el ciclo de transmisión doméstico o silvestre (Miles y col., 1981).

Sin embargo, Lisboa y col. (2000) examinaron 118 ejemplares, de primates (*Leontopithecus rosalia*) capturados en la Reserva Biológica de Poço das Antas, Río de Janeiro, Brazil de los cuales 61 resultaron positivos mediante ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT). Encontrándose la infección de 15 primates con Zimodemo 2 (atribuido originalmente a ciclos domésticos exclusivamente), hecho que pudo haber ocurrido por la ingestión de triatomínicos contaminados con el parásito ya que estos primates además de comer fruta también se alimentan de insectos (Lisboa y col, 2000; Diez y col, 1997).

Estudios posteriores aumentando el número de loci que codifican para diferentes isoenzimas permitió inferir la variabilidad genotípica de estos organismos e incluso evaluar si la misma tiene significado genético, taxonómico y epidemiológico. La incorporación de análisis genéticos tales como el Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del kinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* y el estudio de la huella genética “fingerprinting” basado en la utilización de una secuencia de minisatélite como sonda para hibridar fragmentos de restricción del ADN genómico de *T. cruzi*. permitió corroborar la alta heterogeneidad genética presente en estos parásitos aunque no se logró dividirlos en tipos (Macedo y col., 1992; Morel, 1980). La amplificación de genes de “ARN ribosomal” 24S α mediante la PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa, empleada por Souto y Zingales (1993) indican una heterogeneidad dimórfica mas que heteromórfica, lo cual si les permitió separar el grupo de estudio en dos poblaciones de *T. cruzi*, que además proceden de áreas geográficas diferentes. Posteriormente Souto y col. (1996), caracterizaron aislados provenientes de humanos, vectores y animales silvestres de distintos países suramericanos amplificando las secuencias de la región intragénica del gen miniexón y el “gen de rARN” (rADN) por PCR, observando una evidente correlación entre ambos métodos y permitió proponer la existencia de los linajes (I y II). Así mismo, un análisis reciente de isoenzimas y un Análisis de Polimorfismos del ADN Amplificado Aleatoriamente (RAPD) sugiere que *T. cruzi* puede dividirse en dos linajes filogenéticos y cada uno de ellos sigue manteniendo una alta heterogeneidad (Tibayrenc, 1995). Sin embargo Andrade y

Magalhaes (1997), proponen que si bien el análisis de la heterogeneidad genética ha permitido agrupar a *T. cruzi* en dos grupos, plantean que solo el estudio de la relación hospedero-parásito puede permitir clarificar la importancia de las diferentes cepas en la determinación de las manifestaciones clínico-patológicas de la enfermedad de Chagas, por lo cual proponen la denominación de “Biodemes”, basados en un estudio donde correlacionaron las características biológicas con los patrones de zymodemos y evaluaron en un modelo murino la patogenicidad y el efecto histopatológico de las lesiones producidas por 139 aislados de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiones de centro y Suramérica. De acuerdo con estos resultados existirían tres Biodemes que estarían estrechamente correlacionados con los Zymodemos descritos anteriormente.

Los diferentes esfuerzos en definir si *Trypanosoma cruzi* es una especie o un clonot, es decir un set de grupos de organismos idénticos para un set de marcadores genéticos de una especie clonal (Tibayrenc y Ayala, 1988), y si existen una, dos o mas síntomas correlacionados con los diferentes tipos de *T. cruzi* descritos, motivó la reunión en 1999 de diversos investigadores especialistas en el tema, lo que se denominó “El Meeting Satélite de Río de Janeiro” donde se acordó normalizar la clasificación de los aislados en dos grandes grupos o linajes: *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), y acordar que la enfermedad de Chagas no puede ser considerada como una sola entidad, sino que al menos dos enfermedades se corresponden con los dos linajes definidos (Momen, 1999). Así mismo concluyeron que no era posible dar la categoría de Taxa a *T. cruzi*, ya que

se había detectado la presencia de híbridos putativos de los dos linajes principales y a que existían evidencias de recombinación genética (Bogliolo y col., 1996; Carrasco y col., 1996).

A pesar del esfuerzo para unificar criterios de análisis y nomenclaturas, la aplicación de técnicas novedosas ha permitido evidenciar que la rara ocurrencia de los eventos de recombinación e intercambio genético en *T. cruzi*, no han sido capaces de romper la estructura clonal de las poblaciones pero pueden haber tenido profundos efectos en el proceso evolutivo de este parásito y en consecuencia en su adaptación a nuevos ambientes (vectores y hospederos). Sin embargo, el análisis mediante secuenciación de diversos genes ha permitido dividir el grupo *T. cruzi* II en cinco sub-grupos identificados como IIa, IIb, IIc, IId y IIe (Brisse y col., 2001) que forman parte de dos o tres clades filogenéticos compuesto por IIa, IIb y IIc y dos linajes híbridos IId y IIe que tienen haplotipos híbridos provenientes de TcIIb y TcII como ha sido propuesto por Machado y Ayala (2001), mediante el análisis de dos genes nucleares y una porción del maxicírculo. Los dos linajes entonces denominados como TcI y TcII corresponden en esta nueva nomenclatura a TcI y TcIIa, respectivamente (Brisse y col., 2000). Los trabajos de Di Noia y col. (2002) indican que TcII es más patogénico que TcI y en estudios aislados de *T. cruzi* en modelos murinos Risso y col. (2003) encuentran que la expresión y excreción de trans-Sialidasas implicadas en los fenómenos de invasión y evasión del parásito es mucho más alta

en aislados TcII quienes además producen una mayor mortalidad y lesiones en el timo que en los aislados de TcI.

Sin embargo a pesar de que se tiene un mejor conocimiento de la estructura genética de *Trypanosoma cruzi* y de cual es el origen y organización de los grupos filogenéticos. No ha sido posible aun establecer la asociación entre las patologías y estos linajes de hecho en nuestro país a pesar de que predomina TcI lo encontramos tanto en el ciclo selvático como en el domiciliario, generando casos agudos, crónicos y asintomáticos. Por ello el nuevo enfoque de la teoría Histotrópica Clonal, que plantea la coexistencia de sub-poblaciones heterogéneas en lo que denominados un aislado de *T. cruzi* puede contribuir en la explicación de resultados que puedan ser concluyentes, porque en nuestro país a pesar que predominan TcI y TcIIa, se han encontrado casos agudos (<http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/420831> - fn1#fn1; Consultada: 30 Septiembre 2009)

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Modelo Histotrópico Clonal

Desde la época del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, Vianna (1911) postuló la distribución diferencial de *T. cruzi* en los tejidos y su influencia en la patología de la enfermedad. Sin embargo, Andrade y Magalhães (1997) lograron establecer que las poblaciones multiclonales que infectan a un individuo, presentan clones con tropismos específicos para diferentes tejidos, y es ésta distribución la que puede o no determinar el curso clínico en cada paciente. Así, los clones predominantes en los aislados, pueden ser los responsables del tropismo preferencial hacia los órganos y tejidos específicos. Macedo y col. (1998) sugirieron que se establecen relaciones entre los clones, es decir que los menos adaptados pueden evolucionar genéticamente mediante una complementación metabólica, que generaría diversidad biológica y genética, traducido como evolución clonal. Estos conocimientos podrían conducir al entendimiento de las diferentes manifestaciones clínico-patológicas de la enfermedad de Chagas, que son producto del balance entre los diferentes clones existentes, los cuales presentan comportamientos biológicos particulares y que además coexisten como una “cepa”, lo que se denomina “Modelo Histotrópico de la Enfermedad de Chagas” (Figura 2; Campos y col., 1999, Macedo y col. 2002).

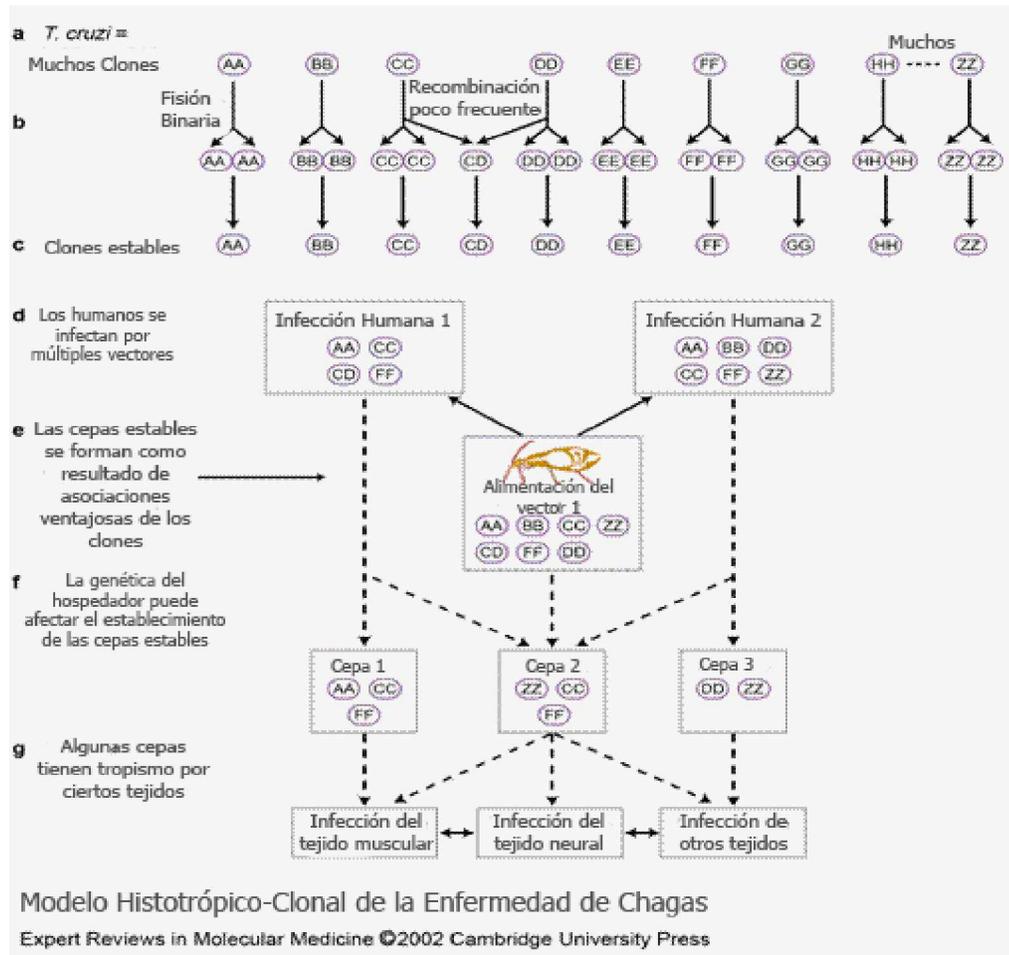


Figura 2.- Modelo Histotrópico de la Enfermedad de Chagas. (Traducido de Macedo y col., 2002).

El desarrollo de este modelo se fundamenta en la variabilidad genética del ADN de los minicórculos del kinetoplasto, bajo la suposición de que el grado de similitud de los perfiles genéticos obtenidos mediante LSSP-PCR son capaces de reflejar en parte la distancia genética entre ellos. La técnica de LSSP-PCR (*Low-Stringency Single Specific Primer*) consiste en una modificación de la PCR convencional, que a partir de un amplicón previamente generado con dos primers

y que posteriormente sirve de blanco a un cebador único y específico que permite observar el polimorfismo intraespecífico de una secuencia de nucleótidos en perfiles electroforéticos únicos, a partir de tejidos de organismos infectados sin la necesidad de aislar el organismo o cultivar el parásito. Los cambios en una base pueden alterar el patrón multibandas generado por la LSSP-PCR y producir nuevos patrones particulares y reproducibles que permiten caracterizar genéticamente un determinado clon (Pena y col, 1994).

Vago y col. (1996), caracterizaron a *T. cruzi* directamente de muestras de tejido de corazón por LSSP-PCR evidenciando la distancia genética entre las subpoblaciones del parásito por los perfiles generados en la corrida; además realizaron comparaciones con el ADN de la huella digital “fingerprinting” de otras cepas del parásito y correlacionaron dicha heterogeneidad genética con la diversidad clonal y, posibles intercambios genéticos generados entre los clones de una cepa (Vago y col, 2000).

Andrade y col. (1999), realizaron infecciones mixtas y por separado en ratones experimentales con dos cepas diferentes y obtuvieron un alto grado de polimorfismo genético tanto en los ratones infectados con ambas cepas como en las infecciones individuales, de acuerdo con los patrones de bandas arrojados en la LSSP-PCR y que pertenecían a diferentes órganos invadidos por las dos poblaciones del parásito.

Vago y col. (2000), utilizaron trece muestras de corazón y cuatro muestras de esófago de distintos pacientes con cardiopatía chagásica crónica, que al ser analizados con LSSP-PCR arrojaron perfiles genéticos variables y distintos para ambos órganos, lo que evidencia una vez más que las sub-poblaciones de *T. cruzi* expresan un histotropismo diferencial, condicionado por la variabilidad genética del mismo es un factor determinante en la aparición de las diversas formas clínicas de la enfermedad.

El uso combinado de técnicas moleculares como la LSSP-PCR y el análisis histopatológico de tejidos infectados nos puede señalar la correlación existente entre el genotipo de una cepa, su histotropismo y el tipo de acción biológica que ejerce en un sistema *in vivo*; esto es debido a su especificidad en la identificación de la distribución diferencial de distintos clones de cepas del parásito inoculados simultáneamente y además se refuerza la importancia de la determinación genética de los polimorfismos de *T. cruzi* en las patologías de la enfermedad de Chagas (Pires y col., 2007).

Para evaluar la influencia genética del hospedador en relación con la acción del parásito y sus posibles variaciones genéticas, Andrade y col. (2002), realizaron infecciones en distintas cepas de ratones (BALB/c, DBA-2, c57Black/6 y Swiss), no isogénicos, con sub-poblaciones de *T. cruzi* (JG y Col1.7G2) caracterizadas genéticamente como TcII y TcI respectivamente, observando un tropismo a los tejidos, similar para BALB/c y la DBA-2, más específicamente hacia el corazón,

en el cual predominó la cepa JG, en tanto que los clones de Col. 1.7G2 migraron hacia el recto y demás órganos. Caso contrario ocurrió con las otras dos cepas de ratones (c57Black/6 y Swiss) donde los mismos clones presentaron un histotropismo diferente, lo que resalta la importancia de la genética y del sistema inmunológico del hospedador en el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

Calderon y col. (2002) asociaron el linaje I con la aparición de cardiopatía y el linaje II con las patologías digestivas (megaesófago y megacolon). Sin embargo, esta correlación es ampliamente discutida por muchos investigadores ya que sugieren que las formas clínicas dependen fundamentalmente de factores genéticos del parásito, el sistema inmune del hospedador y las condiciones geográficas (Macedo y col., 2002).

La intensa variabilidad genética encontrada en los perfiles generados mediante LSSP-PCR de aislados de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad, desde asintomáticos hasta pacientes con lesiones patológicas, infectados con *T. cruzi* II, no permitió correlacionarlos con las manifestaciones clínicas, ni con los patrones encontrados con pacientes de las mismas regiones geográficas. Sin embargo, no se debe desestimar que la variabilidad en los perfiles del ADN del kinetoplasto son el resultado de años de íntima interacción entre el genoma del parásito dentro del hospedero y el sistema inmune del mismo ejerciendo una presión selectiva activa, lo cual puede explicar la dificultad de

asociar el polimorfismo con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Lages-Silva y col., 2006).

Sin embargo, a partir del 2003 el concepto de poblaciones multiclonales es ampliamente discutido debido a los trabajos de Gaunt y col. (2003), en los cuales identificaron experimentalmente que existen algunos mecanismos que provocan variaciones genéticas, los cuales involucran la fusión de genotipos naturales, la hibridización nuclear, pérdida de alelos y recombinación homóloga. Ello llevó a inferir que el parásito ha evolucionado genéticamente de manera independiente por múltiples mecanismos, lo cual ha derivado una compleja heterogeneidad genética, que se evidencia en poblaciones de *T. cruzi* altamente heterogéneas encontradas en la naturaleza y que provienen de diferentes fuentes (Gaunt y col., 2003).

2.2.-Virulencia

La virulencia es un parámetro complejo de definir, lo que ha llevado a controversias entre varios autores. Para algunos involucra la habilidad de *T. cruzi* de transformarse en estadios infectivos, es decir tripomastigotes metacíclicos, los cuales se encuentran en el vector, penetrando las células del epitelio como la piel y las mucosas, evadiendo el sistema inmunológico generadas por el hospedador mamífero (Barrio y col., 2007). Sin embargo, Guzmán-Marín y col., (1999) sostienen que la virulencia de *T. cruzi* depende del número de tripomastigotes inoculados, por otra parte Mazzotti (1940) la atribuye a la susceptibilidad del mamífero al parásito y Phillips (1960) propone que depende de la localización y

multiplicación del parásito en los tejidos infectados; aunque en la naturaleza se encuentra una gran diversidad de cepas del parásito, cuyas variaciones en cuanto a la virulencia, pueden estar relacionadas con la especificidad hospedadora, su distribución geográfica y su tropismo tisular (Guzmán-Marín y col., 1999).

El número y localización de los parásitos en los diferentes tejidos en modelo murino natural y experimentalmente infectado pueden presentar variaciones genéticas que pueden o no estar correlacionadas con una alta o baja parasitemia y lesión tisular de acuerdo a la cepa utilizada y al origen geográfico de la misma (Brener, 1965). Higuchi y col. (1993), demostraron que existe correlación entre la presencia de antígenos de *T. cruzi* y la severidad del infiltrado inflamatorio, exclusivamente en miocardio. Postan y col. (1984), realizaron un estudio con dos clones de *T. cruzi* obtenidos de subpoblaciones heterogéneas de parásitos, donde reportan que los factores genéticos tanto del hospedador como del parásito influyen en la infección.

Carneiro y col. (1991) estudiaron cepas provenientes de pacientes chagásicos crónicos de Brasil que pertenecían a diferentes zimodemos, agrupándolas de acuerdo a su virulencia. Todas las cepas presentaron parasitemia independiente de los zimodemos a los que pertenecían, confirmando la heterogeneidad encontrada por las isoenzimas y patrones del kADN, lo que les permitió corroborar la estructura clonal de esas cepas aisladas de distintos organismos pertenecientes a una misma especie.

Otros autores atribuyen este comportamiento tan variable a la acción de factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de vectores y humanos (Magalhães, 1996).

Existen una serie de parámetros que han sido utilizados para caracterizar biológicamente cepas de *T. cruzi* de acuerdo con la virulencia observada en modelos murinos. Toledo y col. (2002) estudiaron el comportamiento de diferentes aislados de *T. cruzi* en la cepa de ratones BALB/c, midiendo los siguientes parámetros de virulencia: %INF: porcentaje de ratones con parásitos en sangre fresca y/o hemocultivo, %MORT AP/CP: porcentaje de mortalidad durante las fases aguda y crónica de la infección, PPP: primer día con parásitos en sangre fresca examinada (Período Pre-Patente), PP: período con parásitos en sangre fresca examinada (Período Patente), MP: máxima parasitemia (expresada como número de trypomastigotes en 0,1 ml de sangre fresca, observados interdiariamente), DMP: día máximo de parasitemia, PAR: parasitemia (área bajo la curva), %HC AP/CP: porcentaje de ratones con hemocultivo positivos en las fase aguda y crónica de la infección, TP AP/CP: número de tejidos infectados durante la fases aguda y crónica de la infección (clasificado como ausente o presente) y por último IP AP/CP: número de tejidos con procesos inflamatorios durante las fases aguda y crónica (se clasificará como ausente o presente).

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Caracterizar genéticamente con LSSP-PCR aislados de *Trypanosoma cruzi* I y asociarlos con los patrones genéticos obtenidos y con sus propiedades biológicas.

3.2.- Objetivos Específicos

1.- Evaluar y comparar el comportamiento parasitológico e histotrópico en un modelo murino de diferentes aislados de *T. cruzi*.

2.- Caracterizar genéticamente mediante la técnica de LSSP-PCR los parásitos identificados en corazón, hígado, intestino delgado, bazo y músculo esquelético.

3.- Analizar los perfiles genéticos obtenidos con la técnica LSSP-PCR y evaluar su relación con el comportamiento parasitológico, histotrópico y patogénico de las sub-poblaciones presentes en los aislados.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Origen de los de Parásitos

Aislados de Humano: Se seleccionaron aislados pertenecientes al Biobanco del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios del IMT de la UCV. Obtenidos a partir de pacientes que asisten a la consulta del Instituto de Medicina Tropical y fueron caracterizados clínicamente como Chagas Tipo I (X12422) y Chagas Tipo III (X10462) respectivamente, esta última paciente fue tratada con Nifurtimox. Ambos aislados han sido tipificados genéticamente como *T. cruzi* I mediante la técnica de RAPD (Comunicación Personal: Carrasco, 2009).

Aislado de Vector: El aislado de vector se obtuvo del vector *Rhodnius prolixus* colectado en el Jabillal (2009) región endémica ubicada en Acarigua, en el Estado Portuguesa. El mismo estaba infectado y el aislado tipificado genéticamente como *T. cruzi* I mediante RAPD (Comunicación Personal: Carrasco, 2009).

4.2.- Cultivo de Parásitos

Los parásitos obtenidos del triatomino y de los casos de humanos se inocularon en medio de cultivo bifásico de agar sangre y se siguieron hasta su establecimiento. Posteriormente fueron transferidos a medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento por conteo directo de una dilución 1/10 en cámara de Neubauer. Los cultivos se iniciaron con una concentración de 1×10^5 flagelados/mL, se siguió la parasitemia por

cuantificaciones directas sucesivas inter-diarias hasta obtener un número óptimo para la inoculación de los ratones experimentales

4.3.- Modelos Murinos

Ratones Isogénicos: Se utilizaron ratones machos de 10 semanas de edad con un peso de 10-12 gramos aproximadamente, de la cepa isogénica C3H/He, provenientes del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). La cepa de ratones fue seleccionada para controlar la influencia de la variable: “ genética del hospedero”.

Ratones no Isogénicos: Se emplearon machos de 10 semanas de edad con un peso de 10-12 gramos aproximadamente, de la cepa no isogénica IMT, provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Tropical de la UCV. Esta cepa de ratones fue seleccionada para realizar comparaciones del comportamiento biológico e histotropismo diferencial de los aislados de *T. cruzi* estudiados.

4.4.- Infecciones experimentales

Para evaluar las propiedades biológicas e histotrópicas se estableció un protocolo de inoculación que involucra un total de veintiuno (21) ratones de la cepa isogénica C3H/He y/o IMT para cada aislado, los cuales fueron infectados con un inóculo de 1.63×10^5 parásitos/gr de peso del ratón, vía subcutánea de acuerdo al esquema de baja virulencia cuyo objetivo es simular las infecciones que ocurren en la naturaleza (Herrera y col., 2004). Una vez inoculados los ratones, se dividieron en 3 grupos: el primer grupo conformado por nueve (9)

ejemplares se utilizó para evaluar los parámetros de virulencia, seguir la cinética de crecimiento de los parásitos y principalmente el porcentaje de mortalidad. El segundo grupo, conformado por nueve (9) ratones se empleó para realizar la necropsia de los tejidos, el análisis histopatológico y aplicar las pruebas moleculares para diagnosticar la presencia de *T. cruzi* en los órganos seleccionados. El tercer grupo conformado por tres (3) ratones fue inoculado con solución salina y se dejó como grupo de controles sanos. La parasitemia se siguió de acuerdo con el método de Brener (1962) tanto en la cepa de ratones no consanguínea del IMT del Instituto de Medicina Tropical como en la consanguínea C3H/He a fin de evaluar los parámetros señalados y comparar el comportamiento de los aislados

En la fase aguda (10^7 o más tripomastigotes sanguícolas/ml de sangre aproximadamente) o cuando la sintomatología externa (hirsutismo, hepatoesplenomegalia, urinación espontánea) lo reveló, se le extrajo sangre por punción cardíaca y se procedió al sacrificio de los nueve (9) ratones empleados para realizar los análisis histopatológicos y moleculares durante las distintas etapas de acuerdo con el siguiente protocolo: se sacrificaron tres ejemplares al azar en el Período Pre-Patente (PPP), en la fase aguda y se sacrificaron en el día de máxima parasitemia (DMP). El grupo restante se siguió hasta que ocurrió el deceso natural de los roedores para la evaluación los parámetros de virulencia.

4.5.-Evaluación de la virulencia

Se determinaron los siguientes parámetros como criterio para evaluar la virulencia de acuerdo con Toledo y col. (2002)

%INF: porcentaje de ratones con hemocultivo o examinación de sangre fresca positivos.

Mortalidad: expresado a través del porcentaje de muertes en la fase aguda y durante la fase crónica.

PPP: primer día con examinación de sangre positiva.

PP: período con examinación de sangre positiva.

MP: máxima parasitemia expresada en número de tripomastigotes/0.1 ml de sangre detectado diariamente en examinación de sangre fresca.

DMP: día de máxima parasitemia.

4.6.- Necropsia

Se sacrificaron tres animales por cada grupo de ratones infectados con los diferentes aislados en fase inicial, aguda y día de máxima parasitemia y en la fase crónica si el animal la presentaba. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical de acuerdo con las pautas señaladas por el Código de Bioética del FONACIT (CEBioBio, 2008). Se tomaron 2 muestras de los siguientes tejidos: corazón, músculo esquelético, intestino delgado, hígado y bazo; una porción del tejido fue fijada en Formalina-Millonig (10%) para el procesamiento de rutina con inclusión en parafina y tinción con hematoxilina – eosina (H/E). Dos secciones de 5 μ m de grosor separadas entre sí por 60 μ m, fueron examinadas al

microscopio en doble ciego. El parasitismo tisular, la virulencia y aspectos de histopatología fueron descritos y registrados fotográficamente con un microscopio Nikon E 200 con cámara Colpix y /o en un microscopio OLIMPUS BXG2. La otra muestra de tejido fue conservada en RNA later (Ambion) para realizar el aislamiento del ADN de los tejidos.

4.7.- Aislamiento de ADN de tejidos infectados

Se tomaron secciones de 5-10 μm de grosor de muestras de corazón, músculo esquelético, intestino delgado, hígado y bazo que previamente fueron colocadas en RNA later (Ambion). Luego, cada sección de tejido fue digerida con 500 μL de tampón de digestión (60 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA y 0.5% SDS) y 10 μL de proteínasa k (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para liberar el ADN y romper la estructura celular, la incubación se efectuó a 55 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche y con agitación constante (Wright y col, 1990).

El ADN de los tejidos digeridos fue extraído con el kit de purificación “Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI)”, el cual se basa en la cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente su integridad fue confirmada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con un equipo de Fotodocumentación KODAK Digital Science con una cámara DC120.

4.8.- Detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR

Las secciones de órganos preservados en RNA later (Ambion), fueron analizadas para detectar la presencia de ADN de *T. cruzi* mediante PCR. Se amplificó la secuencia de ADN de la región variable del kinetoplasto utilizando los cebadores específicos S35 (3'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA5') y S36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3') (Brito y col., 1995; Ávila y col., 1993). Los tejidos que estaban infectados producían el amplicon de 330 pb de la secuencia diagnóstica para *T. cruzi*

Condiciones de la PCR: 5µL del ADN purificado a partir de cada tejido fue adicionado a 15µL de una mezcla de reacción para PCR (20 mM Tris HCl pH 8.8, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10mM dNTP's, 10 pmol de cada primer y 1 unidad de Taq DNA Polimerasa).

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: Un paso inicial de desnaturalización durante 4 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C, 55 °C y 72 °C durante 1 min cada uno, correspondientes a la hibridización y extensión de los primers y por último una extensión final durante 10 min a 72 °C como extensión final de los productos amplificados; todo este procedimiento se realizó en un termociclador programable MJ Research PTC200.

Los productos de la PCR con los cebadores específicos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa a una concentración final de 1.5% (1/3 agarosa de bajo punto de fusión o Low Melting Point - Agarosa Convencional Invitrogene,) para facilitar la visualización y extracción del fragmento de ADN. Fueron corridos con buffer TBE 1X durante 1 hora a voltaje constante (80 v), luego el gel de agarosa fue teñido con Bromuro de Etidio (2 µL de 50 ng/ml BrEt/100 mL de agua destilada) por 10 min y se lavó con agua destilada por 10 min.

Aquellos tejidos donde no hubo amplificación del fragmento diagnóstico de ADN de *T. cruzi*, fueron analizados para la amplificación de parte del gen constitutivo para la β -actina de ratón, con los iniciadores BACTH1 (5'GCTGTGCTATGTTGCCCTAGAATTCGAGC-3') y BACTH2 (5'-CGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATGTGC-3'), para asegurar que no había infección y no que no hubo amplificación como consecuencia de la inhibición de la reacción de PCR o a la ausencia de ADN purificado. En cada corrida fueron incluidos un control positivo (5 ng de ADN puro de *T. cruzi*) y un control negativo de la reacción (ausencia de ADN del parásito) así como un control de contaminación que contenía agua como templado.

4.9.- Amplificación de la región variable del minicírculo k-ADN por LSSP-PCR

Una vez que se comprobó cuales órganos se encontraban infectados por el parásito se extrajo parte de la banda característica de amplificación correspondiente a 330 pb de cada muestra. Estos fragmentos se fundieron en baño de María y fueron diluidos 10 veces con agua destilada y desionizada (18 Mega OMS, miliQ) (1/10); posteriormente se tomó una alícuota de 5 µl como molde para la reacción de amplificación por LSSP-PCR (Pena y col., 1994).

Condiciones de la PCR: se realizó la amplificación de la región variable del kinetoplasto ADNk con el iniciador 121 modificado (5`-AAATAATG TACGGG GGAGA TG-3`). A 5µl del ADN blanco obtenido de cada tejido se adicionó a 15µL de una mezcla para PCR (20 mm Tris HCl pH 8.8, 50mm KCl, 1.5 mm MgCl₂, 10mm dNTP's, 10 pmol de cada primer y 1 unid de Taq DNA Polimerasa).

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: un paso inicial de desnaturalización durante 4 min a 94 °c, seguido por 35 ciclos de 94 °c, 55 °c y 72 °c de 1min cada uno, correspondientes a la desnaturalización, hibridización y extensión y por último una extensión final durante 10 min a 72 °C (Vago y col., 2000).

Los productos amplificados se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% con el buffer de corrida TBE 1X durante un período de tiempo de 2 horas a voltaje constante (90 v). El revelado de las bandas se efectuó con un kit de Tinción de Plata de la casa comercial Biorad siguiendo las instrucciones del fabricante (ver tabla 2).

Tabla 1.- La Tinción de los geles de poliacrilamida con Nitrato de Plata (Kit Biosilver de Biorad).

ETAPA	REACTIVO	TIEMPO
Fijación	Metanol : Ac. Acético (4:1)	30 min
Oxidación	Oxidante	5 min
Lavado	Agua Miliq (3 lavados)	5 min (c/u)
Tinción	Reactivo de Plata al 10%	20 min
Lavado	Agua miliq	30 seg
Revelado	Revelador	5 – 10 min
Solución de parada	Ac. Acético al 15%	15 min

4.10.- Análisis de los patrones de amplificación

Los fragmentos obtenidos mediante LSSP-PCR fueron analizados directamente sobre los registros fotográficos para determinar la presencia (1) o ausencia (0) de un fragmento en particular. Se construyó una matriz binaria con el objetivo de evaluar en los fragmentos presentes en los diferentes órganos de los ratones infectados con los tres aislados de *T. cruzi* estudiados. Para calcular la diversidad genética a partir de los perfiles generados se utilizó el programa POPGENE versión 1.31 que permite el cálculo del índice de Nei's que permite

determinar distancia e identidad genética. Los dendogramas producidos por este programa fueron dibujados utilizando el programa TreeView Taxonomy and Systematics at Glasgow 1.6.6.

Los gráficos y análisis estadísticos se construyeron con el software libre “R” Foundation for Statistical Computing program, version 2.9.2 (Copyright 2006, *The R Foundation for Statistical Computing*, ISBN 3-900051-07-0).

4.11.- Aspectos Bioéticos

La manipulación de las muestras biológicas utilizadas en este proyecto, cuenta con el aval del Comité Ético Científico del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, quien además hace el seguimiento correspondiente. Este trabajo está enmarcado dentro del Proyecto Fonacit de Grupo G-2005000827.

5.- RESULTADOS

5.1.- *Curvas de Parasitemia y de Supervivencia*

Para evaluar las propiedades biológicas e histotrópicas de los aislados se seleccionó un modelo murino con dos cepas de ratones C3H/He e IMT, los cuales fueron infectados vía subcutánea de acuerdo al esquema de baja virulencia cuyo objetivo es simular las infecciones que ocurren en la naturaleza (Herrera y col., 2004). Las curvas de parasitemia y supervivencia fueron realizadas en el programa R versión 2.9.2 (R Development Core Team, 2009).

La cinética de la infección en ratones isogénicos C3H/He del aislado X10462 de *T. cruzi*, puede ser analizada en la figura 3, Estos ratones desarrollaron una infección consistente con un cuadro agudo de la enfermedad de Chagas en dicho modelo murino. La fase prepatente duró cinco días post-inoculación (PPP) y detectándose el incremento progresivo de la parasitemia a medida que transcurrió el tiempo de observación, a este período se le denomina fase aguda, en la cual se observó la aparición de algunos síntomas severos en los ratones tales como: alopecia, urinación espontánea, ictericia e inflamación del hígado y bazo en apariencia externa de dilación abdominal, alcanzando un máximo de parasitemia de $5,36 \times 10^6$ parásitos/mL de sangre, inmediatamente después se produjo la muerte de los ratones (ver tabla 2).

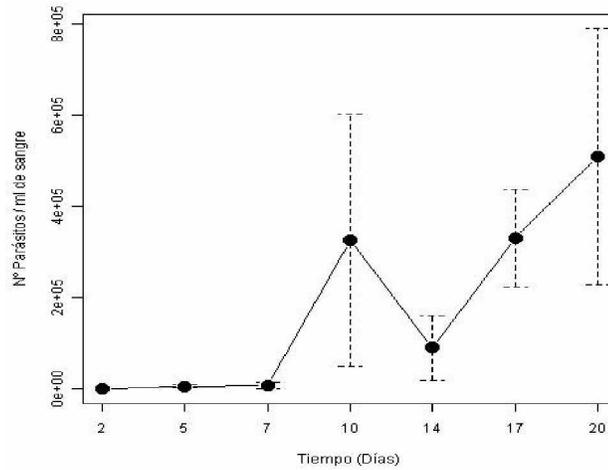


Figura 3.- Curva de Parasitemia del aislado X10462 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones isogénicos C3H/He.

En forma análoga, se siguió el curso de la infección del aislado de *T. cruzi* X10462 en ratones no isogénicos de la cepa IMT como se muestra en la figura 4. La fase inaparente (PPP) se prolongó por siete días post-inoculación (PPP) y se observó el incremento del número de parásitos medida que avanzó la infección, generando un comportamiento típico de una infección aguda, así mismo se hicieron evidentes algunos de los síntomas observados en los ratones C3H/He, tales como: urinación espontánea, ictericia alopecia y posteriormente se produjo la muerte de los roedores.

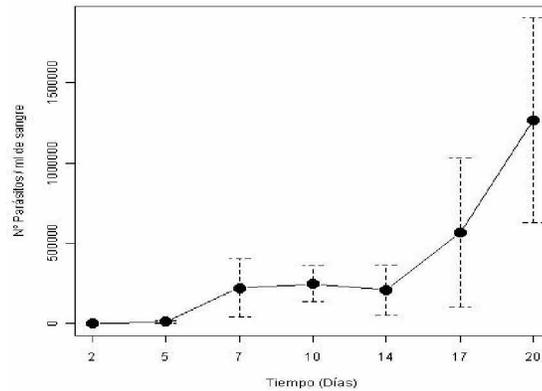


Figura 4.- Curva de Parasitemia del aislado X10462 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.

A diferencia del aislado X10462, el X12422 no desarrolló una parasitemia evidente en sangre en los ratones C3H/He, a pesar que se siguieron esquemas de inoculación donde se aumentó la cantidad de parásitos. Sin embargo, al analizar el comportamiento de la cepa en ratones IMT, tal como se muestra en la figura 5 la misma desarrolló un comportamiento típico de una infección crónica experimental, la cual comprende las etapas características de la enfermedad de Chagas; una fase inaparente que duró 13 días post-infección, luego se produce un incremento del número de trypomastigotes sanguíneas circulantes hasta alcanzar un pico de 1.59×10^5 parásitos/mL de sangre (DMP), que ocurre a los 40 días a partir de allí decrece la cantidad de parásitos observados y comienza la fase crónica de la enfermedad (ver tabla 2), en la cual se observaron algunos síntomas tales como alopecia y urinación espontánea y no hay deceso de los ratones infectados.

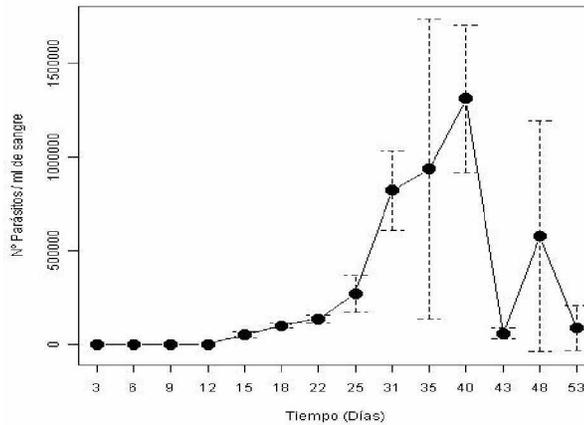


Figura 5.- Curva de Parasitemia del aislado X12422 proveniente de un humano con Enfermedad de Chagas en fase Crónica en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.

Así mismo, se inoculó un aislado de *T. cruzi* proveniente de un vector (*R. prolixus*) recientemente colectado en una comunidad rural del estado Portuguesa para poder establecer comparaciones en cuanto al comportamiento biológico, histotrópico y genético entre los aislados provenientes de diferentes fuentes. Dicho aislado PJRP109 se inoculó bajo las mismas condiciones descritas en la metodología en ratones IMT ya que por problemas técnicos no se disponía de la cepa de ratones C3H/He. Según muestra la figura 6, el aislado PJRP109 tuvo un PPP que duró 13 días post-infección, luego se produce un incremento del número de los parásitos circulantes en sangre hasta alcanzar un pico (DMP) de $7,12 \times 10^4$ parásitos/mL de sangre, que ocurre a los 20 días y a partir de allí decrece la cantidad de trypomastigotes sanguícolas observados (ver figura 6; tabla2). Los síntomas observados fueron alopecia, ictericia y urinación espontánea y se produjo el deceso progresivo de los ratones.

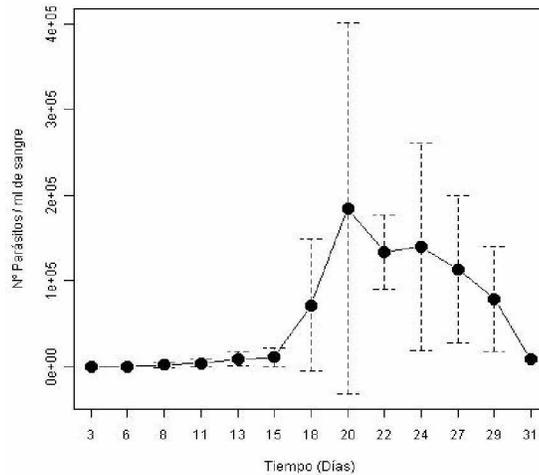


Figura 6.- Curva de Parasitemia del aislado PJRP109 proveniente de un vector colectado en una zona endémica del Estado Portuguesa, en un modelo murino con ratones no isogénicos IMT.

Para cada grupo de ratones experimentales (C3H/He e IMT) inoculados con los aislados seleccionados, se evaluó la mortalidad como un parámetro de virulencia primordial ya que aportaría datos importantes acerca de la patogenicidad de cada aislado (ver tabla 2). De acuerdo con la figura 7, se observa que el aislado X12422 (color azul) resultó ser menos mortal para los ratones, ya que la sobrevivencia acumulada fue de 1, tanto en la cepa C3H/He como IMT durante mas de cuarenta días post-inoculación, lo que se traduce como una mayor longevidad con respecto a los demás aislados, por lo que se procedió con la necropsia de los mismos para realizar las pruebas histopatológicas y moleculares posteriores. Sin embargo, el aislado X10462 (color rojo (C3H) y verde (IMT)) resultó ser muy mortal causando la muerte de los ratones de ambas cepas en apenas veinte días. Así mismo el aislado PJRP109 (color negro) mostró ser

patogénico en los ratones IMT pero la supervivencia acumulada como se aprecia en la figura fue de 31 días aproximadamente post- infección, lo que sugiere que de los tres aislados evaluados el que resultó ser mas patogénico basados en la supervivencia acumulada fue X10462, ya que ocasionó la muerte de su hospedador en menor tiempo con respecto a los demás aislados (ver tabla 2).

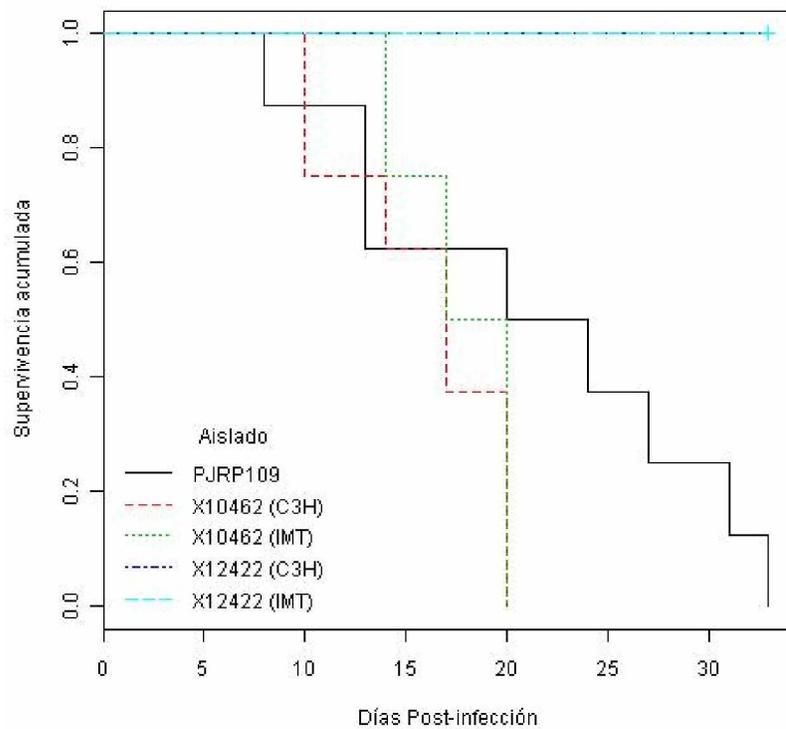


Figura 7.- Curva de Supervivencia de ratones experimentales C3H/He e IMT inoculados X10462 y X12422 y con el aislado PJRP109 en ratones IMT.

Tabla 2.- Cuadro comparativo de la evaluación de los parámetros de biológicos para los aislados X10462, x12422 y PJRP109 en modelos murinos (C3H/He-IMT)

CEPAS	X10462 (C3H/He)	X10462 (IMT)	X12422 (C3H/He)	X12422 (IMT)	PJRP109 (IMT)
INF	100 %	100 %	-	100 %	100 %
Mortalidad	100 %	100 %	-	0 %	100 %
PPP	5 días	7 días	-	13 días	13 días
PP	20 días	20 días	-	53 días	31 días
MP * (para/mL)	$5,36 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	-	1.59×10^5	$7,12 \times 10^4$
DMP	D20	D20	-	D40	D20

INF: % ratones positivos en sangre fresca.*par/mL= N° parásitos por mililitros.

Al analizar conjuntamente el comportamiento generado por los aislados seleccionados encontramos que en el porcentaje de ratones infectados fue de 100% en todos los aislados a excepción del X12422 en el modelo murino C3H/He. Si embargo al analizar los resultados de los aislados X10462 y PJRP109 fueron muy similares, observándose un porcentaje de mortalidad en los ratones infectados experimentalmente de 100% aunque la supervivencia acumulada fue diferente (ver figura 7), ya que los roedores infectados con PJRP109 alcanzaron a sobrevivir 11 días más que los infectados con X10462. Ambos aislados desarrollaron un cuadro de Chagas agudo y la parasitemia mas elevada fue observada con el aislado X10462. Caso contrario ocurrió con los ratones infectados con el aislado X12422 que a pesar de infectar los ejemplares utilizados no provocó el fallecimiento de los mismos y desarrolló un cuadro de Chagas crónico experimental.

5.2.- Necropsia de los ratones y análisis histológico de los tejidos

Durante la necropsia de los ratones C3H/He e IMT, se tomaron los órganos (corazón, hígado, intestino delgado, bazo y músculo esquelético) y se les practicó cortes de 3-5 µm aproximadamente, que posteriormente fueron teñidos con H/E y analizados en microscopios Nikon E con cámara Colpix y OLIMPUS BXG2 con cámara integrada. La muestra de corazón perteneciente al aislado X10462 se le realizaron cortes longitudinalmente, por lo que las fibras musculares (F) se observaron dispuestas horizontalmente, presentan una marcada eosinofilia, sus núcleos son centrales (n). En el PPP se encontró un amastigote en el interior de un macrófago y algunas zonas con pequeñas fibrosis (f) (ver figura 8A). Al observar la figura 8B correspondiente al sacrificio en la fase aguda, se pudieron observar pequeños pseudoquistes de amastigotes invadiendo las células del tejido cardíaco con una abundancia de 6-8 nidos por corte, mientras que en el último período de sacrificio se apreció una alta invasión de las fibras cardíacas causando separación de las mismas (fibrosis) y con infiltrados inflamatorios (i) severos altamente basófilos, mientras que la abundancia de nidos de alcanzó a más de 30 pseudoquistes por corte de tejido (ver figura 8C). El corte de musculatura esquelética fue realizado longitudinalmente, por lo que las fibras musculares se observan paralelamente y presentan una coloración eosinófila (F), son multinucleadas. Se observó invasión tisular demostrando la presencia de *T. cruzi* con una abundancia de 1-3 pseudoquistes por corte, con pequeños infiltrados inflamatorios y separación de las fibras del tejido (ver figura 8D). En el hígado se observó pérdida de la histoarquitectura normal del tejido e infiltrados

inflamatorios (ver figura 8E). Tanto en bazo como en intestino delgado no se apreció daño histopatológico evidente.

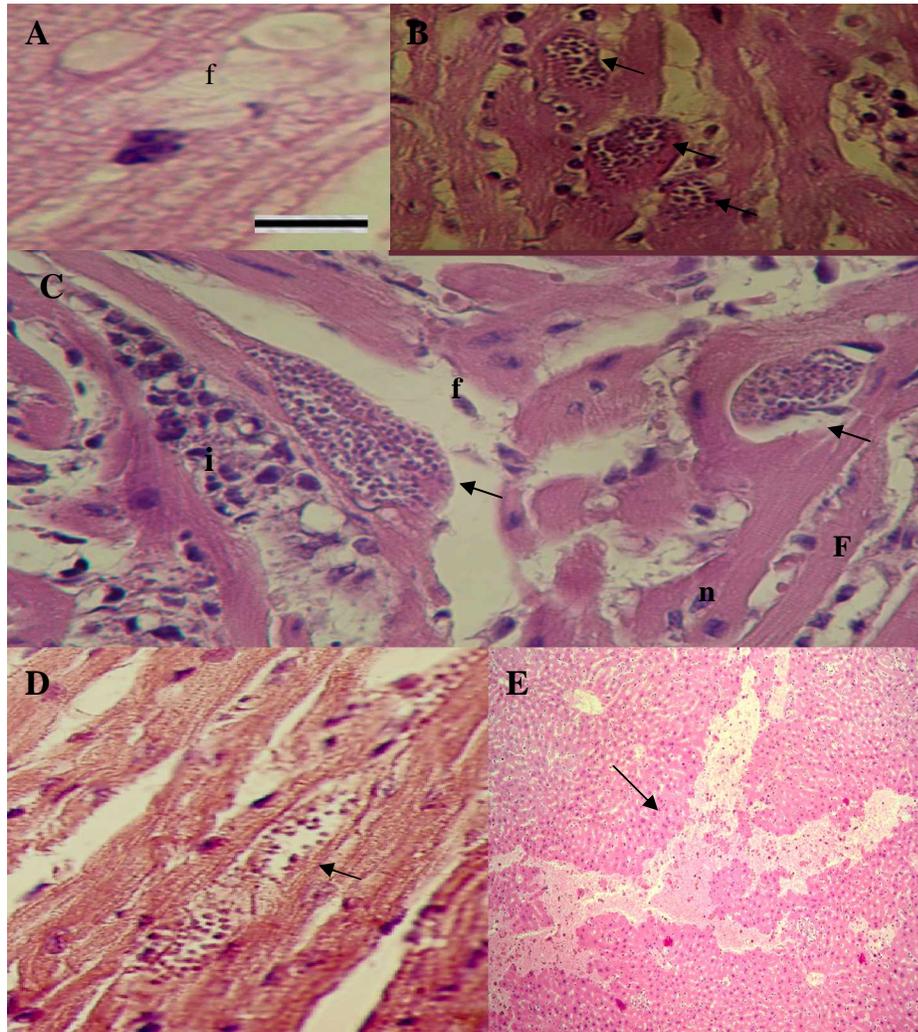


Figura 8.- Parasitismo tisular en ratones C3H/He infectados experimentalmente con un aislado de *T. cruzi* (X10462). Músculo Cardíaco invadido por pseudoquistes de amastigotes (1000x (A), 400x (B) y 100x (C) con fibrosis e infiltrados inflamatorios. Pseudoquistes de amastigotes en Músculo Esquelético tomado a 400x (D) y daño tisular en Hígado 100x (E); (H/E, Escala de la barra 15 μ m; Microscopio Nikon E con cámara Colpix).

En el análisis histopatológico del aislado X12422, se observa un corte longitudinal de la musculatura cardíaca, en el cual las fibras musculares (F) se encuentran dispuestas horizontalmente y presentan una coloración eosinófila, sus núcleos son centrales y están teñidos altamente basófilos (n), al observar el corte se aprecia muy poca invasión de *T. cruzi* en la musculatura cardíaca con la presencia de un pseudoquiste de amastigotes invadiendo las células del tejido muscular, causando fibrosis (f) y generando pequeños focos de infiltrados inflamatorios (ver figura 9A). En el corte longitudinal de musculatura esquelética, se distinguen las fibras musculares dispuestas paralelamente que presentan una coloración eosinófila (F) y son multinucleadas. Se observó mayor invasión tisular demostrando la presencia de *T. cruzi* con una abundancia 6-10 nidos de amastigotes con fibrosis e infiltrados inflamatorios (ver figura 9B). En el hígado se observó una leve pérdida de la continuidad de los hepatocitos (ver figura 9C), tanto en bazo como intestino delgado no se observó daño tisular evidente.

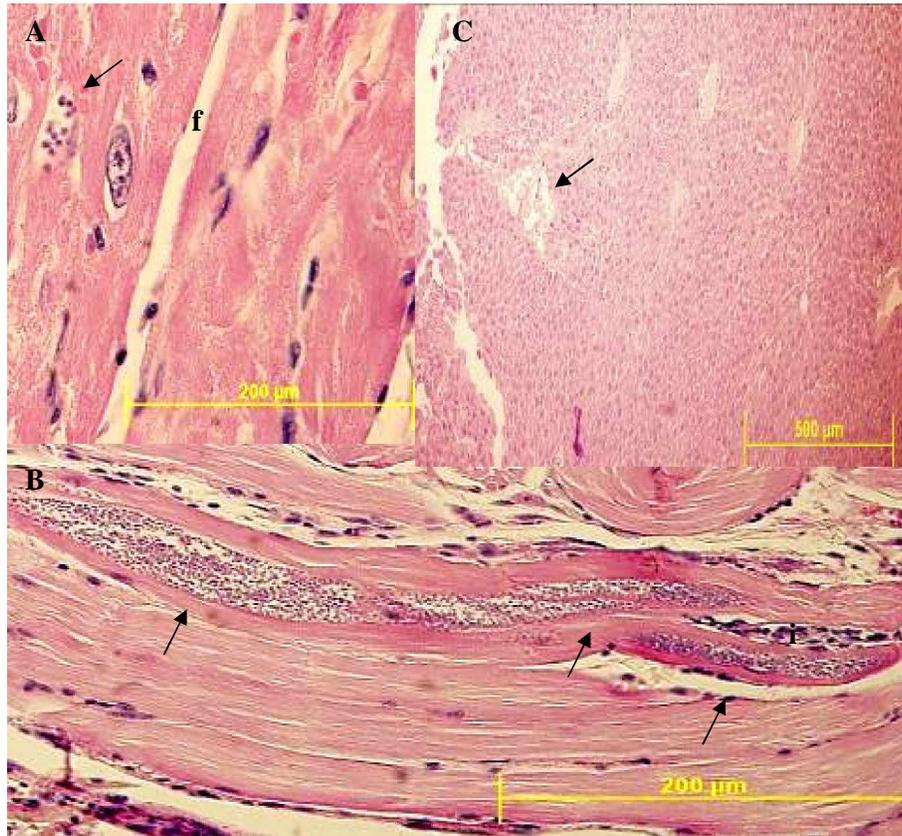


Figura 9.- Parasitismo tisular en ratones IMT infectados experimentalmente con un aislado de *T. cruzi* (X12422). Músculo Cardíaco invadido por pseudoquistes de amastigotes a 400x (A), con fibrosis. Pseudoquistes de amastigotes en Músculo Esquelético tomado a 400x (B) y daño tisular en Hígado 100x (C); Teñidos con H/E y visualizados en un microscopio Olympus BXG2.

Paralelamente se realizó el análisis histológico de los tejidos provenientes del aislado PJRP109, encontrándose invasión tisular en la musculatura cardíaca en los diferentes tiempos de necropsia (PPP, fase aguda y último sacrificio). En la figura 10A correspondiente al sacrificio durante el PPP se observa un corte longitudinal de la musculatura cardíaca cuyas fibras se disponen horizontalmente y presentan una marcada eosinofilia, mientras que el núcleo es central y basófilo, además se aprecia pequeños infiltrados inflamatorios (i) y pseudoquistes de amastigotes con

una abundancia 2-5 nidos por corte. En el sacrificio correspondiente a la fase aguda se distingue un corte transversal del músculo cardíaco, cuyas fibras tienen contornos redondeados o poligonales. No obstante algunas fibras en general son irregulares y poseen un contorno alargado son altamente eosinófilos y su núcleo se mantiene en la posición central y una marcada basofilia. En este corte se observó el incremento de los pseudoquistes en la fase aguda de la infección encontrándose pseudoquistes de amastigotes y un nido con trypomastigotes, la abundancia fue de 9-15 nidos por corte (ver figura 10B), además de infiltrados inflamatorios (i) y la separación de las fibras cardíacas (f) provocada por la alta invasión del parásito en el tejido. En las figuras 10C y 10D se observa un corte longitudinal de la musculatura esquelética cuyas fibras están dispuestas paralelamente y se tiñen eosinófila mientras que sus núcleos son altamente basófilos, logró evidenciar la invasión tisular por la presencia de 1 o 2 pseudoquistes de amastigotes pequeños dentro de la fibra muscular y algunos focos de fibrosis tisular. En el resto de los tejidos no se observó pérdida de la arquitectura normal, aunque en el intestino delgado se observó una pequeña fibrosis.

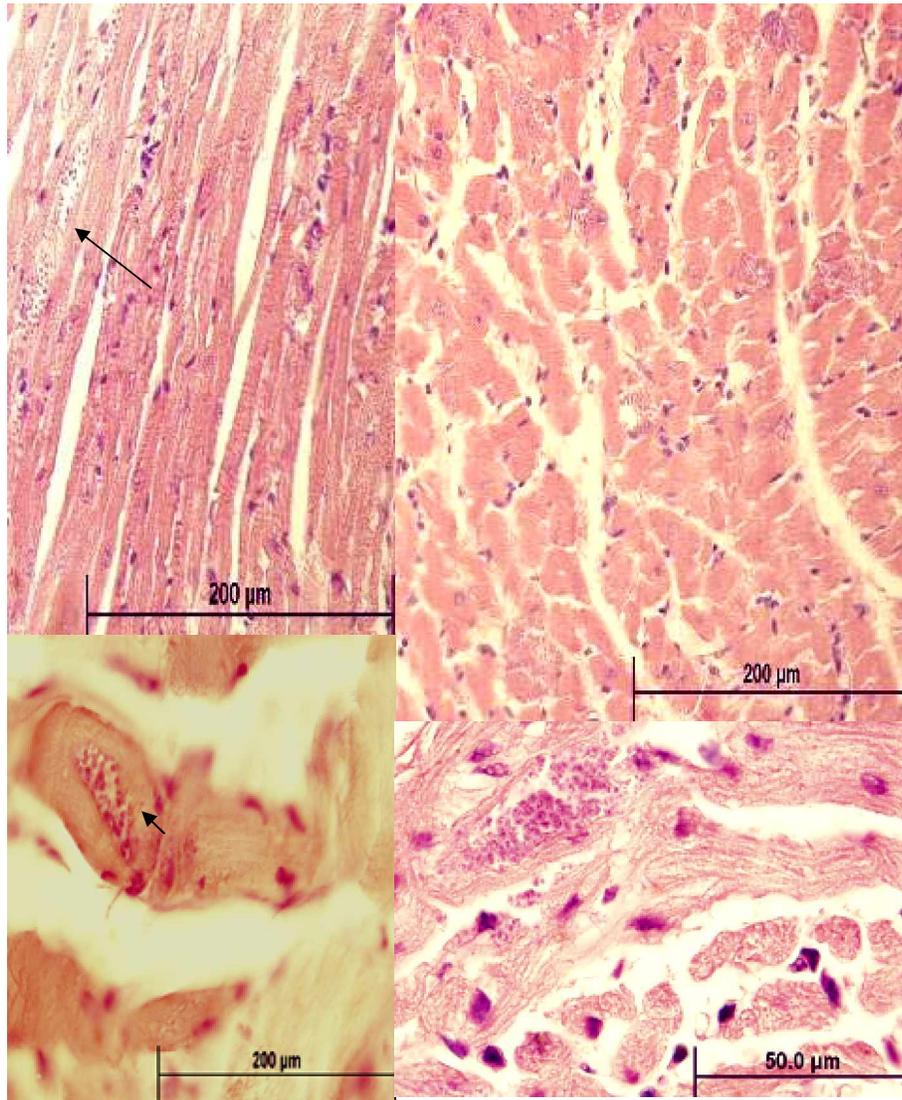


Figura 10.- Parasitismo tisular en ratones IMT infectados experimentalmente con un aislado de *T. cruzi* (PJRP109). Músculo Cardíaco invadido por pseudoquistes de amastigotes a 400x (A y B), con algunos focos de fibrosis. Pseudoquistes de amastigotes en Músculo Esquelético tomado a 400x (C) perteneciente al sacrificio en el PPP y Músculo Esquelético tomado a 100x (D) correspondiente al sacrificio en fase aguda. (Teñidos con H/E y visualizados en microscopio Olympus BXG2).

5.3.- Análisis Moleculares

El resto de tejido preservado en RNA later (corazón, hígado, intestino delgado, bazo y músculo esquelético) fue tomado para la realización del análisis molecular. Una vez obtenido el ADN se aplicó la reacción PCR, a fin de confirmar que tejidos estaban infectados con *T. cruzi*, debido a que se observa una banda diagnóstica de 330 pb correspondiente a la amplificación de la regiones variables del kADN del parásito (ver figuras 11,12 y 13).

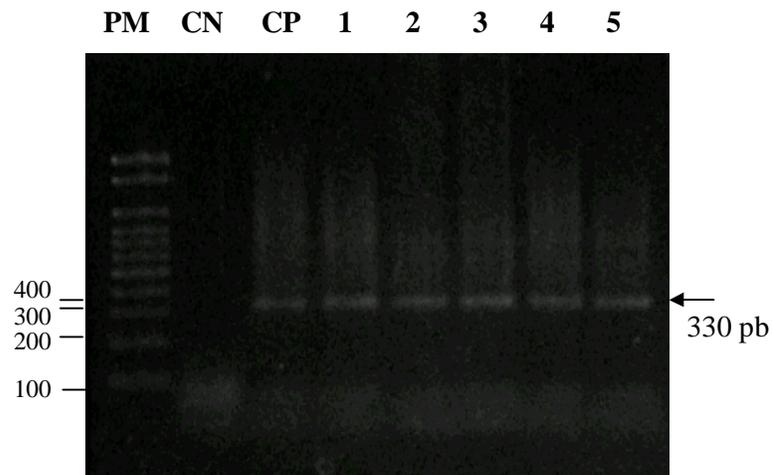


Figura 11.- Identificación de los tejidos infectados de ratones infectados experimentalmente mediante PCR del aislado de *T. cruzi* X10462. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axigen); CN: Control Negativo, línea 1: Corazón, línea 2: Hígado, línea 3: Intestino Delg., línea 4: Bazo, línea 5: Musc. Esq.

La reacción de PCR aplicada a los ADN extraídos de los órganos seleccionados, para todos los aislados (X10462, X12422 y PJRP109), generaron resultados positivos en todas las muestras, es decir que hubo amplificación del fragmento diagnóstico de 330 pb del kADN, lo cual es otra evidencia que refuerza la presencia del parásito en tejido. Esto permitió corroborar con metodologías

moleculares específicas, el tropismo diferencial de *T. cruzi* en modelos murinos (ver figura 11,12 y 13).

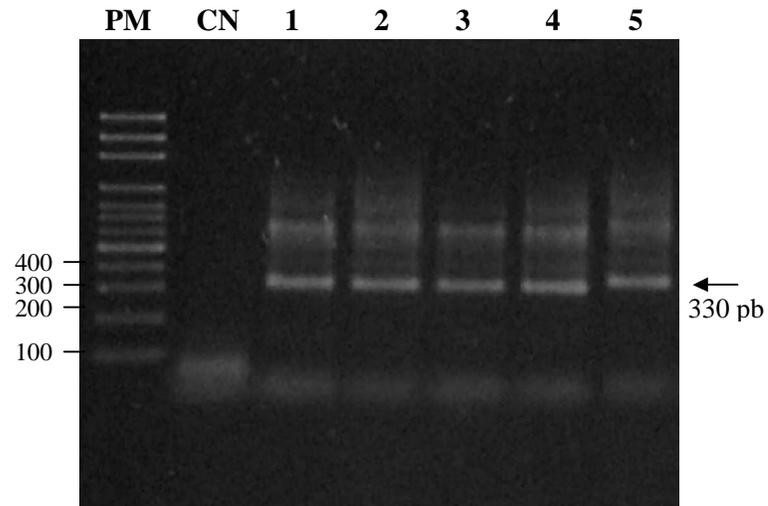


Figura 12.- Identificación de los tejidos infectados de ratones infectados experimentalmente mediante PCR del aislado de *T. cruzi* X12422. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axigen); CN: Control Negativo; línea 1: Corazón, línea 2: Hígado, línea 3: Bazo, línea 4: Intestino Delgado; línea 5: Musc. Esq.

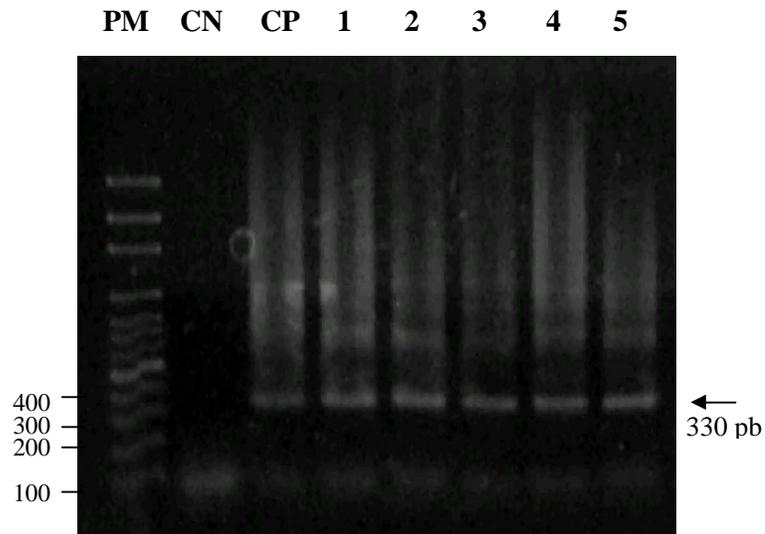


Figura 13.- Identificación de los tejidos infectados de ratones infectados experimentalmente mediante PCR del aislado de *T. cruzi* PJRP109 en el PPP. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axigen); CN: Control Negativo; CP: Control Positivo; línea 1: Corazón, línea 2: Hígado, línea 3: Bazo, línea 4: Intestino Delgado; línea 5: Musc. Esq.

Partiendo de los resultados obtenidos mediante la PCR se tomó el fragmento diagnóstico (330 pb) de cada una de las muestras y se aplicó la reacción LSSP-PCR que permitió detectar la heterogeneidad genética presente en los aislados estudiados para cada uno de los tejidos seleccionados, arrojando patrones de bandas únicos directamente de tejidos, lo cual es reproducible en geles de acrilamida al 6% teñidos con Plata (ver metodología).

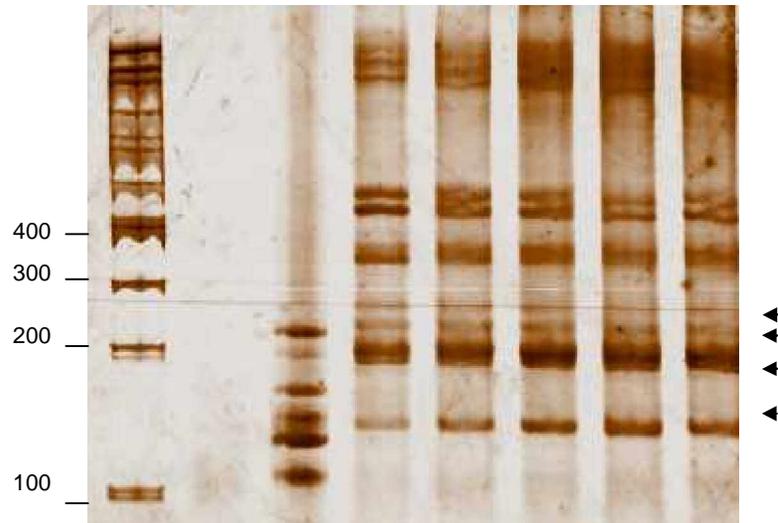


Figura 14.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en el PPP. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo; CP: Control Positivo, línea 1: Corazón; línea 2: Hígado; línea 3: Int. Delg.; línea 4: Bazo; línea 5: Musc. Esq.

En la figura 14, se presenta el perfil electroforético generado por los tejidos procesados en el PPP (5 días) de la infección. Se tomó este punto para detectar las sub-poblaciones de parásitos que conforman este aislado y conocer el tropismo tisular específico de cada uno de ellos. Al observar el gel se evidencia un patrón multibandas (12 bandas aproximadamente), el cual es idéntico en todos los órganos estudiados y diferente al control positivo aislado de otra fuente (vector).

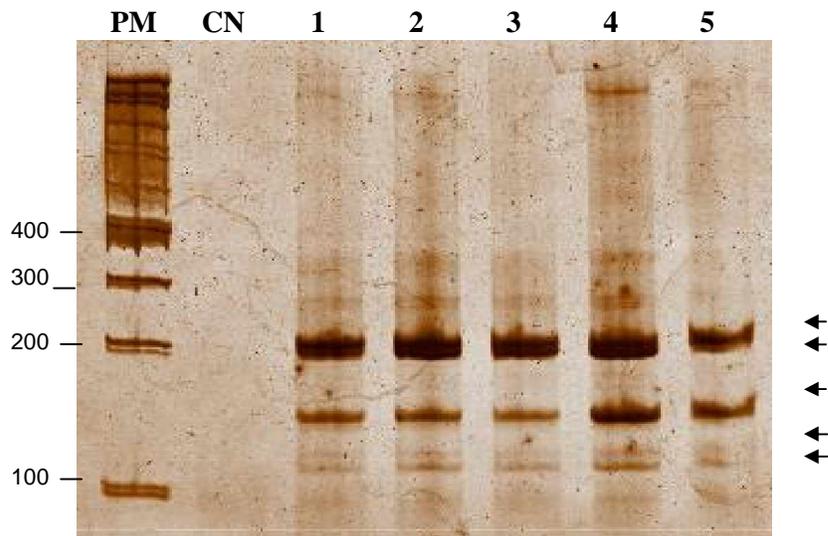


Figura 15.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en la fase aguda. PM: marcador de peso molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo; línea 1: Corazón; línea 2: Hígado; línea 3: Int. Delg.; línea 4: Bazo; línea 5: Musc. Esq.

Al analizar el patrón de bandas (figura 15), proveniente de los tejidos infectados que fueron procesados en la fase aguda de la infección (17 días después) se aprecia la disminución del número de bandas generadas por la LSSP-PCR en todos los órganos (9 bandas aproximadamente), aunque se mantiene un perfil único e idéntico en los tejidos estudiados. Tres días mas tarde se produjo el DMP el cual coincidió con la muerte de lo ratones por lo que se realizó la necropsia de los mismos y se le practicó el análisis molecular pertinente. Se aplicó la LSSP-PCR, la cual generó perfiles de bandas idénticos en todos los tejidos y una disminución de las sub-poblaciones presentes al inicio del experimento (ver figura 16).

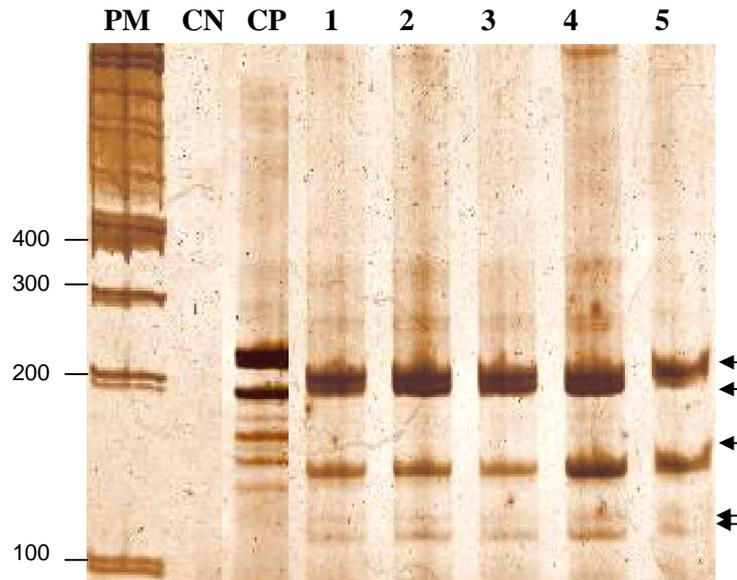


Figura 15.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X10462 en el DMP. PM: marcador de peso molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, CP: Control Positivo; línea 1: Corazón; línea 2: Hígado; línea 3: Int. Delg.; línea 4: Bazo; línea 5: Musc. Esq.

No obstante, se inoculó el aislado X10462 en otra cepa de ratones (IMT, no isogénicos) con el objetivo de dilucidar si hubo un proceso de selección de subpoblaciones que conforman ese aislado y que pudo ser provocado por las características propias de ese hospedador o fue generado por el organismo de la paciente infectada y al tomar la muestra sobrevivieron los más abundantes. Al analizar el gel se observa un perfil multibanda poco heterogéneo e idéntico al observado en la cepa de ratones isogénicos (C3H/He) en el PPP (ver figura 14). Esto sugiere que si hubo una selección previa de clones en la paciente y se ve reflejado al comparar ambos resultados (dato no mostrado).

Al comparar los resultados observados en el aislado X10462 con los obtenidos para el aislado X12422, se aprecia que el comportamiento histotrópico de las sub-

poblaciones presentes en este aislado fue distinto en las dos cepas de ratones (isogénico/C3H y no isogénicos/IMT), encontrándose diferencias bien marcadas en los perfiles multibandas generados en el ensayo LSSP-PCR de los tejidos seleccionados, de La heterogeneidad genética mostrada por este aislado en comparación con X10462 es evidente, ya que los patrones arrojados en corazón, bazo, músculo esquelético e hígado son diferentes entre sí y entre cada cepa de ratón como se observa en las figuras 17 y 18. Donde las flecha reflejan la ausencia de fragmentos en los tejidos.

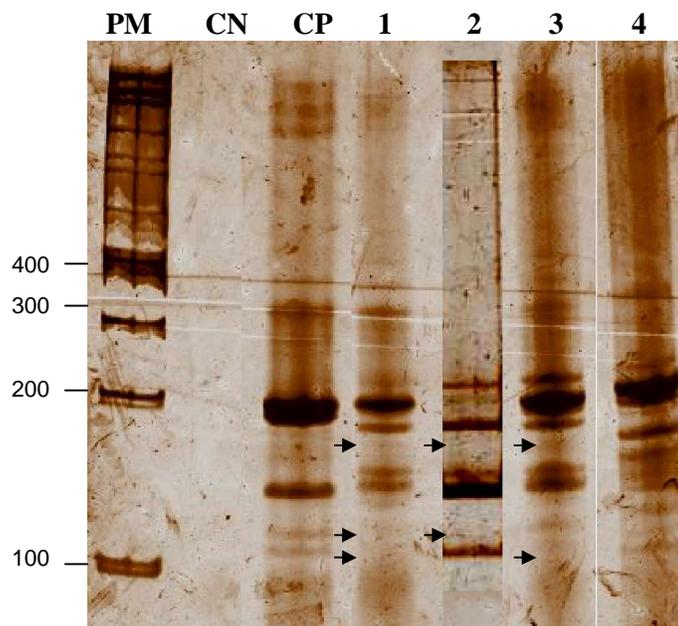


Figura 16.- Perfil electroforético generado mediante por LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He infectados experimentalmente con el aislado X12422. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, CP: Control Positivo; línea 1: Corazón; línea 2: Musc. Esq.; línea 3: Bazo; línea 4: Hígado.

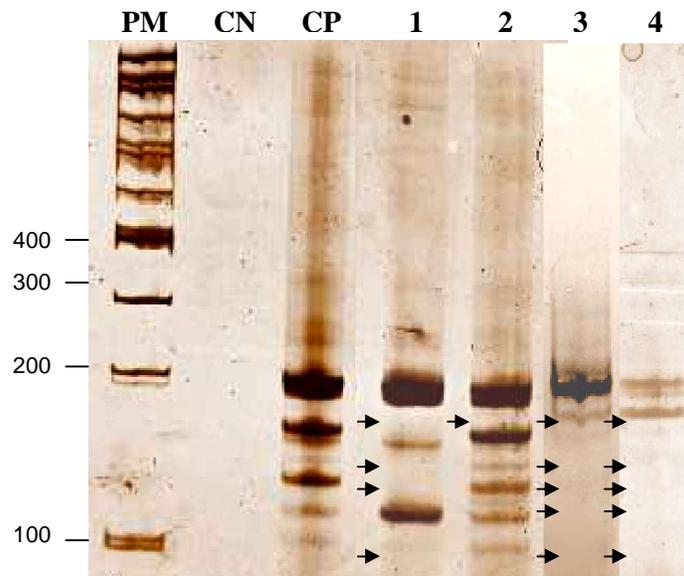


Figura 18.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado X12422. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, CP: Control Positivo; línea 1: Int. Delg.; línea 2: Bazo; línea 3: Hígado; línea 4: Corazón.

Así mismo se realizó el análisis molecular de los tejidos provenientes del aislado PJRP109 en los tres tiempos de sacrificio (PPP, fase aguda y en el último sacrificio). En la figura 19 correspondiente al PPP (13 días post-inoculación), se observa un perfil de bandas homogéneo entre los tejidos con un número de 7 bandas aproximadamente de un tamaño menor que 200 pb, por lo que se empleó un control positivo aislado de otra fuente (humano), y se aprecia claramente que el perfil generado por el control y los observados en los diferentes tejidos son distintos.

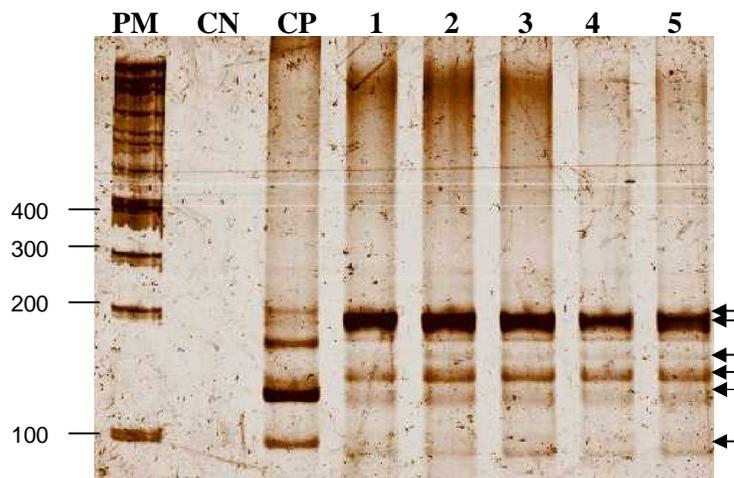


Figura 19.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en el PPP. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, línea 1: Corazón; línea 2: Hígado; línea 3: Int. Delg.; línea 4: Bazo; línea 5: Musc. Esq.

En el siguiente sacrificio realizado durante la fase aguda de la infección, se analizó el perfil electroforético generado por los tejidos procesados y se evidencia que no amplificaron algunos de los fragmentos observados en el perfil obtenido en la figura 19. En el hígado, intestino y bazo se aprecia claramente la ausencia de la banda ubicada por debajo de los 100 pb, la cual se mantiene en los dos órganos restantes, y en el caso de músculo esquelético no se logra visualizar el fragmento de 280 pb presente en los demás (ver figura 20). Así mismo se logró observar el perfil electroforético generado en los tejidos durante el último sacrificio y se aprecia claramente la diferencia en el número de bandas obtenidas en cada órgano, donde la ausencia de fragmentos representada con flechas permite evidenciar una vez más el histotropismo preferencial de los parásitos y un proceso de filtración

de las sub-poblaciones que conforman un este aislado en el modelo murino (ver figura 21).

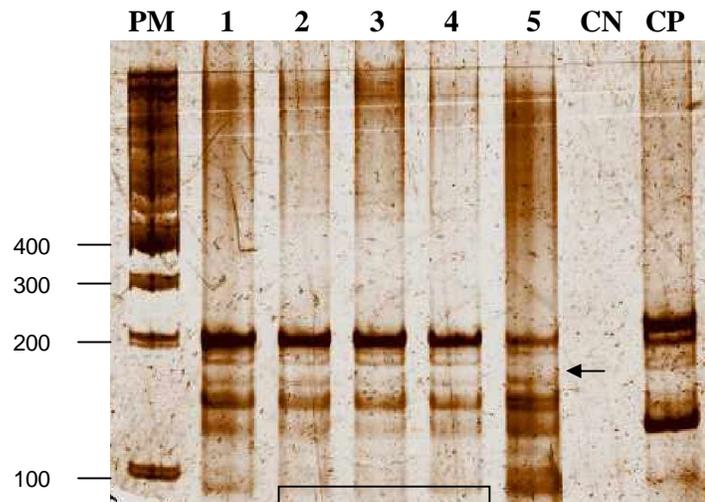


Figura 20.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en la fase aguda. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, línea 1: Corazón; línea 2: Hígado; línea 3: Int. Delg.; línea 4: Bazo; línea 5: Musc. Esq.

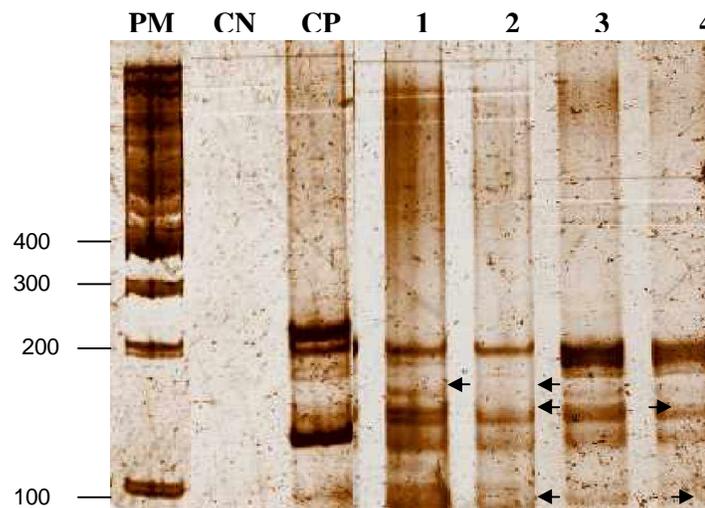


Figura 21.- Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones IMT infectados experimentalmente con el aislado PJRP109 en el último sacrificio. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo; CP: Control Positivo, línea 1: Hígado; línea 2: Musc. Esq; línea 3: Corazón; línea 4: Bazo.

5.4.- Análisis de Diversidad Genética

El análisis de Diversidad Genética se utilizó para cuantificar la separación o agrupación de sub-poblaciones presentes en los diferentes tejidos pertenecientes a cada aislado, reflejado en los dendogramas, se utilizó el programa POPGENE, el cual generó análisis de distancias genéticas basadas en las distancias de Nei's (1978), así como la relación entre las sub-poblaciones de parásitos (ver figuras 22-26).

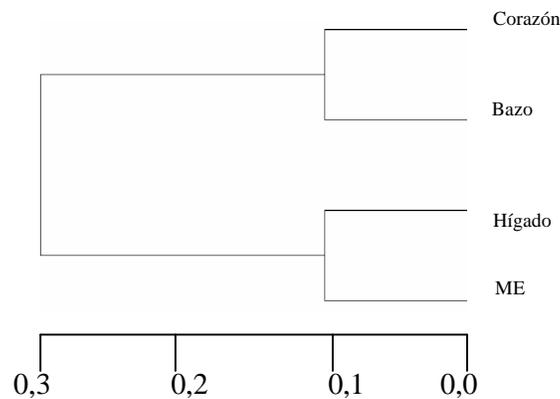


Figura 22.- Dendograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de X12422 inoculados en ratones C3H/He, basado en las distancias genéticas de Nei's.

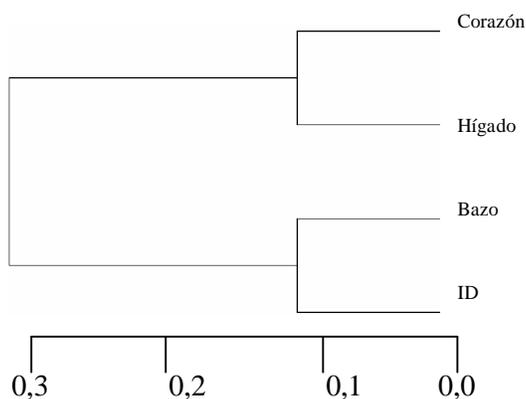


Figura 23.- Dendrograma de agrupamiento por distancia genética de las sub-poblaciones presentes en los tejidos provenientes de X12422 inoculados en ratones IMT, basado en las distancias genéticas de Nei's.

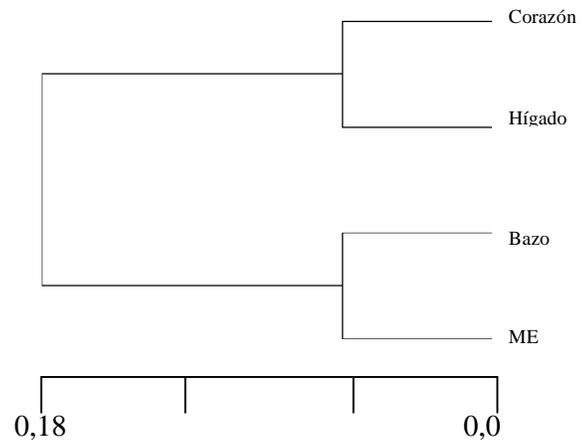


Figura 25.- Dendrograma de agrupamiento por distancia genética de las subpoblaciones presentes en los tejidos provenientes de PJRP109 inoculados en ratones IMT en el último sacrificio, basado en las distancias genéticas de Nei's.

6.- DISCUSION

La caracterización biológica de los aislados seleccionados de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y de un vector recientemente colectado permitió establecer diferencias relacionadas con las características biológicas y moleculares de *T. cruzi* en cuanto a niveles de parasitemia observados y el histotropismo diferencial en los tejidos analizados en ratones experimentales (C3H/He, IMT).

El aislado X10462, proveniente de una paciente chagásica crónica resultó ser muy virulento y patogénico, provocando una infección aguda experimental, una elevada parasitemia y un porcentaje de mortalidad de 100% en un período de tiempo de 20 días aproximadamente tanto en los ratones isogénicos como en los no isogénicos donde la parasitemia encontrada fue del mismo orden de magnitud, además se detectó la infección en todos los órganos estudiados, lo que indica que el aislado presenta características intrínsecas que pudieron ser responsables de la virulencia y patogenicidad sin importar la genética del hospedador, tal como puede observarse en la tabla 2.

Por el contrario el aislado X12422, presentó un comportamiento diferente en las dos cepas de ratones evaluados. En la cepa IMT, la tasa de crecimiento fue lenta pero con una alta parasitemia y fue menos patógena en comparación con la X10462. En ambas cepas de ratón se desarrolló un cuadro clínico comparable con un Chagas crónico experimental, si consideramos que sobrevivieron en el transcurso de la infección y la mortalidad fue cero, (ver tabla 2 y figura 5),

mientras que en los ratones inoculados con el aislado X10462 se produjo el fallecimiento masivo de los ejemplares en un corto período de tiempo, en ambos modelos murinos. El aislado PJRP109 tuvo un comportamiento muy similar al X10462, a pesar de provenir de otro origen, el fallecimiento de los ratones fue progresivo y en un tiempo mayor que el observado para el aislado X10462.

Al realizar el análisis histopatológico tanto en los tejidos pertenecientes a la cepa C3H/He como a la IMT se encontró que el aislado X10462 invade preferencialmente los cardiomiocitos y aunque no se cuantificó la carga parasitaria por órgano, fue posible asociar el nivel de parasitemia presente con la intensidad de invasión mediante la observación y determinación de la abundancia de nidos de amastigotes en las diferentes etapas de sacrificio. La presencia y abundancia de pseudoquistes de amastigotes en este aislado, generó algunas lesiones en tejido cardíaco tales como: fibrosis e infiltrados inflamatorios. Este aislado fue encontrado invadiendo las células de otros tejidos como musculatura esquelética con una abundancia de nidos de amastigotes muy baja, presencia de pequeños focos de fibrosis e infiltrados inflamatorios y causando daño en la arquitectura normal de las células hepáticas en ambos modelos murinos aunque no se muestran los resultados histológicos obtenidos en los ratones IMT (ver figura 8). Este resultado es consistente con las características asociadas a los aislados pertenecientes a TcI, los cuales son predominantemente miotrópicos (Andrade y col., 1999). Esta invasión tan masiva en los cardiomiocitos fue posiblemente, un factor determinante en la alta patogenicidad mostrada por este aislado, causando

la muerte de sus hospedadores experimentales en un corto período de tiempo. Es de hacer notar que el paciente infectado, a partir del cual se obtuvo este aislado actualmente tiene un diagnóstico de Chagas III y presenta insuficiencia cardíaca severa. Al comparar este hallazgo histológico con los resultados encontrados para el aislado X12422, se encontró que las células de la musculatura esquelética fueron preferencialmente invadidas por el parásito con respecto a los otros tejidos, formando pseudoquistes de amastigotes, y numerosos focos inflamatorios, fibrosis tisular. En el tejido cardíaco se encontró un pequeño nido amastigotes en el tejido hepático alteraciones en la continuidad de las células (ver figura 9). La invasión preferencial de este aislado en musculatura esquelética en comparación con el aislado X10462, cuya invasión fue principalmente en músculo cardíaco, podría explicar la mayor longevidad observada en los ratones infectados con el aislado x12422. Esta aparente “preferencia diferencial” entre el tejido cardíaco y el esquelético ha sido descrita previamente tanto para aislados Mexicanos como Chilenos pertenecientes a TcI independientemente del origen y/o el área geográfica (Pizzi y col., 2005; Bice y col., 1970).

El histotropismo preferencial del aislado PJRP109 hacia musculatura cardíaca y en menor grado a la musculatura esquelética (ver figura 10) fue muy similar al observado con el aislado X10462, ambos pertenecientes al linaje TcI, contrasta con los resultados obtenidos por Risso y col. (2003) quienes atribuyen una mayor capacidad patogénica a los aislados TcII, como consecuencia de la mayor expresión de las trans-Sialidasas. Por ello sería interesante evaluar la expresión de

dichas enzimas en los aislados X10462, X12422 y PJRP109. Así mismo estos resultados contradicen lo expresado por Di Noia y col (2002), quienes sostienen que los parásitos pertenecientes al linaje TcII son los que predominantemente están infectando humanos, basado en que solo encontró anticuerpos contra las proteínas “mucina like” TSSA en pacientes chagásicos infectados con *T. cruzi* II.

La aplicación de la técnica de PCR una metodología más poderosa y sensible que las técnicas histológicas, permitió corroborar la panifectividad de *T. cruzi* incluso en aquellos tejidos donde no se logro observar la presencia del parásito pero si los efectos de su presencia. La utilización de la técnica de LSSP-PCR por otro lado, permitió caracterizar genéticamente los aislados de *T. cruzi*, basados en el ligamiento en desequilibrio que existe entre los genes nucleares y los genes presentes en el kinetoplasto, los cuales no segregan independientemente en los procesos de división celular y su transferencia a la progenie no es de manera aleatoria por lo cual no se produce su separación.(Macedo y Pena, 1998; Vago y col, 2000; Burgos y col., 2005) Razones por las cuales el análisis de los genes del kinetoplasto puede reflejar la composición genética del aislado.

Así mismo la LSSP-PCR puede hacerse directamente sobre el ADN de los tejidos seleccionados (corazón, hígado, intestino delgado, bazo y músculo esquelético) sin la necesidad del cultivo de los parásitos que pudiera actuar como un factor selectivo y filtrar la composición de las sub-poblaciones presentes en los distintos órganos.

La aplicación de la LSSP-PCR al ADN aislado de los órganos infectados (corazón, hígado, intestino delgado, bazo y músculo esquelético) con X10462, provenientes de ratones isogénicos y no isogénicos, permitió observar un perfil de bandas muy homogéneo, lo que parece indicar la presencia de un aislado que no muestra histotropismo diferencial de las posibles sub-poblaciones presentes.

Al analizar los perfiles obtenidos en las tres etapas en las que se realizó el sacrificio de los ratones (PPP, MP y DMP), se observa que el patrón de amplificación es el mismo en todos los órganos y a medida que transcurre la enfermedad, los fragmentos de ADN amplificados cuyo peso molecular fue de 200, 150, 130 y 120 pb están presentes tanto en PPP como en la fase aguda y en el DMP, (la intensidad de la tinción de las bandas de 120 y 130 pb es débil en el PPP) (ver figuras 14, 15 y 16). Esta homogeneidad genética encontrada en este aislado nos lleva a especular que pudo ocurrir un proceso de selección de las sub-poblaciones presentes en el organismo de la paciente, producto de la interacción parásito-hospedador. Una alternativa a esta suposición, es que la homogeneidad genética observada en este aislado pudo ser el resultado de la selección de sub-poblaciones resistentes al Nifurtimox, dado que la paciente a partir de la cual se aisló la cepa X10462, cumplió tratamiento con dicha droga y posterior a ello se obtuvo el aislado de *T. cruzi*. (Coronado y col, 2006) (ver figura 27).

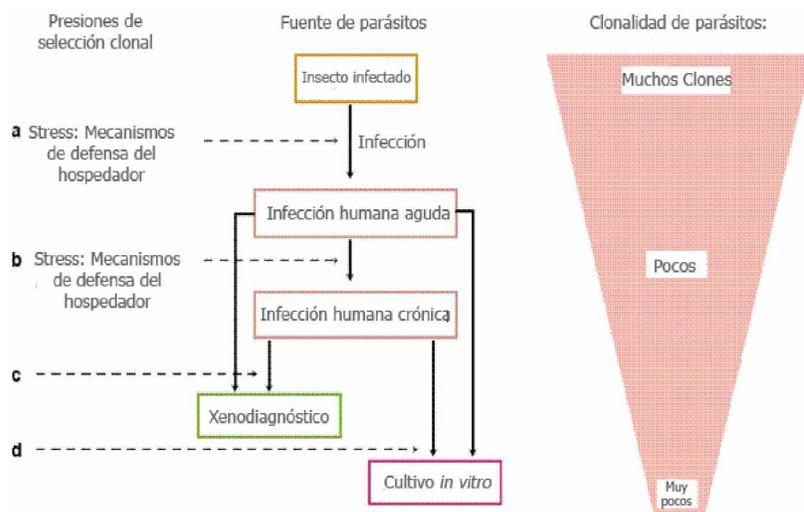


Figura 27.- Representación de los procesos que inducen la reducción de la heterogeneidad de cepas multiclonales en la Enfermedad de Chagas. (Modificado de Macedo y col., 2002).

Es importante señalar que durante el PPP, existen bandas cuyo peso molecular es mayor que el del fragmento que se empleó como molde (330 pb) en la reacción de LSSP-PCR, lo cual es posible explicar porque los productos de las amplificaciones iniciales pueden servir como primers en los últimos ciclos de la replicación (Pena y col., 1994; ver figura 14).

A diferencia de lo encontrado con el aislado X10462, la caracterización genética mediante LSSP-PCR del aislado X12422 presentes en los tejidos de corazón, hígado, bazo, y músculo esquelético en el modelo murino C3H/He y en el IMT evidenció la amplificación de perfiles de bandas heterogéneos y diferentes en todos los órganos y entre los dos modelos. En los patrones de amplificación obtenidos a partir del corazón aislado de C3H/He no se observan los fragmentos de 180, 120 y 110 pb, en músculo esquelético los fragmentos de 180 y 120 pb y la

banda característica de 200 pb presenta menor intensidad en comparación con los demás tejidos, en el bazo no amplifican los fragmentos de 180 y 110 pb y en el hígado es posible observar la presencia de todas las bandas (ver figura 17). Utilizando el criterio de la presencia y ausencia de bandas se generó una matriz utilizando el Índice de Diversidad Genética de Nei's, mediante el programa POPGENE, que permite medir la diversidad genética existente entre las sub-poblaciones presentes en los diferentes órganos estudiados y generar el dendograma que se muestra en la figura 22.

Este análisis genera un índice cuyo valor promedio es de 0,30 cercano a cero lo que indica la existencia de diversidad genética entre las sub-poblaciones presentes en los diferentes órganos, el dendograma generado a partir de estos estadísticos permitió evidenciar la existencia de al menos dos sub-poblaciones diferentes de parásitos muy cercanas entre si, así fue posible agrupar las sub-poblaciones de parásitos presentes en corazón y bazo y sepáralas de las presente en de músculo esquelético e hígado (aunque el pequeño numero de fragmentos y órganos analizados no permite generar los estadísticos que dan significancia a este resultado). Lo cual indica una mayor diversidad de genotipos y una mayor complejidad genética en comparación con el aislado X10462 esta heterogeneidad genética de las sub-poblaciones identificadas en los diferentes órganos puede explicarse por la preferencia de los clones y su tropismo diferencial a tejidos específicos, facilitando su multiplicación en los mismos. Hecho que puede ser asociado con los análisis histopatológicos donde se observó una mayor

invasividad en músculo esquelético, tejido que presentaba la mayor heterogeneidad en los perfiles electroforéticos en comparación con lo encontrado en la musculatura cardíaca.

En el análisis de X12422 inoculado en ratones IMT se observó alta heterogeneidad del ADN del parásito recuperado de los tejidos encontrándose en el bazo un mayor número de fragmentos y solo está ausente la banda de 170 pb observada en corazón e hígado y en el resto de los órganos solo es posible observar una o dos bandas de 200-190 pb y otro fragmento de 170 pb (ver figura 17).

Aunque los perfiles observados en los ratones IMT son diferentes a los encontrados en los ratones C3H/He. El análisis cladístico generó un índice de distancia genética de Nei's muy similar 0,39. Resultado esperable puesto que se trata del mismo aislado. Sin embargo al observar los dendogramas producidos, corazón e hígado pertenecen a un mismo grupo mientras que en C3H/He se asocian en grupos diferentes (ver figura 23).

Esta diferencia en agrupación de las diferentes sub-poblaciones representadas por los perfiles electroforéticos podría asociarse a que tenemos poblaciones heterogéneas con histotropismo diferencial distinto y que al enfrentarlas a un hospedador con una mayor heterocigocidad, las nuevas interacciones que se establecen entre el hospedador y el parásito sean quienes determinen la diferencia

de distribución de las sub-poblaciones del parásito en los tejidos del hospedador como sugiere Vago y col. (2000). Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Freitas y col., 2009, quienes demostraron que la presencia de diferentes haplotipos (H-2^d/H-2^b) de ratones isogénicos y no isogénicos puede intervenir considerablemente en la distribución diferencial de las cepas de *T. cruzi* en sus hospedadores, ya que estos genes están involucrados en procesos inmunológicos, tales como: presentación de antígenos, respuestas inmunológicas y componentes del complemento siendo los C3H/He portadores del gen H-2^k, el cual se ubica dentro de los genes del MHC de clase I junto con H-2^d y H-2^q que son genes de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.

Sin embargo cuando se analiza el aislado independientemente del hospedador en que fue inoculado, es decir generando una matriz con los perfiles obtenidos se eleva el valor del Índice de Nei's a 0,50 y se observa una reasociación de las sub-poblaciones en tres grupos principales siendo las poblaciones evidenciadas en hígado y bazo de IMT las que se asocian al resto a una mayor distancia (0,5). Así mismo las sub-poblaciones presentes en corazón de ambos hospedadores son más similares entre sí y más distantes según el modelo estadístico, que las presentes en el tercer grupo de que asocia músculo esquelético, hígado, bazo e intestino. Estos resultados parecen indicar que la genética del hospedador podría influir directamente en el histotropismo diferencial de las sub-poblaciones que conforman un aislado, tal como mencionamos anteriormente, siendo posible separar sub-poblaciones que no se observaron como un grupo diferente en el ratón

isogénico. Lo que si es claro es que la distancia genética es prácticamente la misma entre las sub-poblaciones analizadas en un mismo tipo de hospedador, pero la misma aumenta y deja en evidencia la existencia de nuevos grupos al analizar el aislado en forma integral, es decir con los perfiles generados en los dos hospedadores (isogénicos y no isogénicos) (ver figura 24).

En la caracterización genética del aislado PJRP109 en ratones IMT se esperaba encontrar alta variabilidad de genotipos, en concordancia con lo establecido por el modelo Histotrópico Clonal, partiendo de que proviene de un vector colectado en una zona endémica con una seropositividad de 19% en humanos (Carrasco y col., 2009) y no fue estabilizado en cultivos sino que su contenido intestinal fue utilizado como fuente de inóculo para el infección experimental. Los análisis de los perfiles electroforéticos mostraron una alta heterogeneidad, lo cual es lógico porque en condiciones naturales, el mismo podría encontrarse infectado con más de una sub-población del parásito. El sinergismo o la selección de sub poblaciones de *T. cruzi* en el vector podría ser el reflejo de los genotipos predominantes en un área geográfica específica (Marcet y col., 2006). El análisis mediante la utilización de dendogramas revela una alta heterogeneidad, a través del índice de diversidad genética combinado en este caso con una alta patogenicidad y virulencia en el modelo murino utilizado. Permitiendo evidenciar cambios en los perfiles de bandas generados mediante la técnica de LSSP-PCR de los órganos infectados en el paso de PPP hasta el momento del último sacrificio. En el estudio se obtuvo un perfil multibandas

bastante heterogéneo, prácticamente idéntico en todos los tejidos que correspondían al PPP donde se observaron 6 bandas de menor peso molecular al del amplicón, las bandas son menores de 200 pb (ver figura 19). Sin embargo al analizar el perfil generado por los tejidos en la medida que transcurría la infección se observa la desaparición de fragmentos en los perfiles generados por el ADN de los parásitos presentes en los tejidos estudiados, hecho que podría estar evidenciando selección de las sub-poblaciones del parásito presentes en el PPP a medida que transcurre la infección en los ratones (ver figura 20). Así mismo en el último sacrificio continua este proceso de filtración dentro del hospedador y en músculo esquelético no se observan los fragmentos de 170 y 180 pb, mientras que hígado se aprecia la disminución de la intensidad de la banda de 200 pb con respecto a los demás órganos y por último en el bazo se nota la ausencia del fragmento de 100 pb que estaba presente en el sacrificio de la fase aguda (ver figura 21).

Aplicando el análisis de conglomerados a los perfiles generados tanto en la fase aguda como en el período del último sacrificio se obtiene el menor índice promedio de Nei's lo que demuestra la mayor heterogeneidad presente en este aislado, siendo el mismo de 0.18 en el último sacrificio y de 0,1 en la fase Aguda (ver figuras 25 y 26).

La utilización de la técnica molecular LSSP-PCR puede constituir una valiosa herramienta en los estudios epidemiológicos de infecciones tanto humanas como experimentales porque demuestra el tropismo diferencial del parásito, la variabilidad genética encontrada en ellos y a su vez en algunos casos podría permitir la correlación de las lesiones encontradas en los tejidos con su presencia en los mismos.

Sin embargo, esta técnica presenta una serie de limitaciones principalmente porque su blanco está dirigido a las variaciones de los minicírculos de ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* y no emplea secuencias del genoma nuclear del parásito, donde probablemente se este generando los procesos mas importantes de variabilidad genética y a su vez no nos permite conocer el número de los parásitos que se encuentren en una determinada muestra (Silva Valladares y col., 2008). Por lo cual, se recomienda el uso combinado de técnicas moleculares y parasitológicas que permitan realizar una caracterización completa de los aislados de *T. cruzi* provenientes de diferentes fuentes (vector, reservorio y humano).

7.- CONCLUSIONES

Ü Todos los aislados estudiados pertenecen al linaje TcI y mostraron marcadas diferencias en cuanto a virulencia y patogenicidad en el modelo murino.

Ü El aislado X10462 resultó ser muy patogénico y el perfil de bandas generado resultó prácticamente idéntico en los diferentes órganos a diferencia del aislado X12422, el cual mostró menos patogenicidad y los patrones de bandas amplificadas fueron más heterogéneos incluso en diferentes hospedadores.

Ü El aislado X10462 mostró un histotropismo preferencial hacia corazón, mientras que el X12422 invadió predominantemente músculo esquelético, lo que pudiera asociarse a los cuadros clínicos de Chagas agudo y Chagas crónico experimental observados en el modelo murino.

Ü El hospedador influye en la distribución diferencial de las sub-poblaciones de parásitos que constituyen un aislado de *T. cruzi* en los diferentes órganos.

Ü La técnica de LSSP-PCR permitió corroborar el tropismo diferencial del parásito y demostrar la heterogeneidad genética del parásito encontrada en cada uno de los tejidos provenientes del modelo murino empleado.

8.- RECOMENDACIONES

Ü Inocular el aislado PJRP109 en ratones isogénicos C3H/He para comparar el comportamiento biológico e histotrópico en una cepa de hospedador diferente y observar si se presentan diferencias o el comportamiento es similar.

Ü Se recomienda realizar clonamiento de cada uno de los aislados trabajados en este proyecto con el fin de realizar infecciones experimentales en los modelos murinos empleados y caracterizarlos de acuerdo con el histotropismo observado en cada clon y las patologías observadas en los diferentes órganos.

Ü Evaluar la expresión de las trans-Sialidasas u otro factor de virulencia empleando estos aislados pertenecientes al linaje TcI, ya que de acuerdo a lo reportado por Risso y col. (2003) son los TcII capaces de inducir la mortalidad del 100% de los ratones y en nuestros resultados dos de los aislados (X10462 y PJRP109) se comportaron de la misma manera.

Ü Cuantificar la carga parasitaria presente en cada órgano mediante técnicas moleculares como PCR en tiempo real y poder correlacionar la cantidad de parásitos con los daños titulares observados con cada aislado.

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, Z., Andrade, S., Corrrea, R., Sadirgursky, M., Ferrans, V. 1994. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Amer J of Pathol.* **144:** 1403-1411.

Andrade S., Magalhães J. 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* **30:** 27-35.

Andrade, S., Machado, C., Chiari, E., Pena, S., Macedo, A. 1999. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Mol Bioch Parsitol.* **100:** 163-172.

Andrade, L., Machado, C., Chiari, E., Pena, S., Macedo, A. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol.* **100:** 269–275.

Avila, H., Pereira, H., Thiemann, O., Pavia, E., Degrave, W., Morel, C., 1993. 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. Cli. Microbiol.* **31:** 2421-2426.

Barrio, A., Voorhis, W., Basombrío, M. 2007. *Trypanosoma cruzi*: Attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. *Exp Parasitol.* **117:** 382-389.

Bice, B., Zeledon, R. 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi*: (Chagas 1909). *J Parasitol.* **56:** 663-70.

Bogliolo, A., Lauria-Pires, L., gibson, W. 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.* **61:** 31-40.

Brener, Z. 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop.* **18:** 1-8.

Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M. 2000. Identification for six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA multilocus enzyme electrophoresis. *Int J. Parasitol.* **30:** 35-44.

Britto, C., Cardoso, M., Ravel, C., Santoro A., Pereira J., Coura J., Morel C. y colaboradores. 1995. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and non-radioactive hybridization. *Exp Parasitol.* **81**: 462–471.

Burgos, J., Begher, S., Freitas, J., Bisio, M., Duffi, T., Tejeiro, R., Schijman, A. y colaboradores. 2005. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in patient with AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 1016-1018.

Calderón, O., Troyo, A., Valerio, I., Chinchilla, M., 2002. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol. Latinoam.* **57**: 40-5.

Campos, R., Gonçães, M., dos Reis, E., dos Reis, M., Andrade, S. 1999. Comparative analysis by polimerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 23-9.

Carneiro, M., Romanha, A., Chiari, E. 1991. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **86**:387-97.

Carrasco, H., Frame, I., Valente, S., Miles, M. 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in silvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 418-424.

Chagas C. 1909. Nova Tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen; n.sp; Agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* **1**: 159-218.

Comisión de Ética, Bioética y Bioseguridad (CEBioBio) 2008. Normas de bioética y bioseguridad para la investigación con organismos vivos y ambiente. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología. 22-33.

Dietz, J., Peres, C., Pinder, L., 1997. Foraging ecology and use of space in wild golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) *Am. J. Primatology.* **118**: 161-166.

Di Noia, J., Buscaglia, C., De Marchi, C., Almeida, I., Frasc, A. 2002. *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med*; **195**: 401–13.

Gaunt, M., Yeo, M., Frame, I., Stothard, J., Carrasco, H., Taylor, M., Mena, S. 2003. Mechanism of genetic Exchange in American trypanosomes. *Nature*. **421**: 936-939.

Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., Rosado-Barrera, M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed*. **10**: 177-184.

Herrera L., das Chagas S., Viegas C., Martínez C., Cotias P., Carrasco H., Urdaneta-Morales S. y colaboradores. 2004. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp. Parasitol*. **107**: 78–88.

Higuchi, M., de Brito, T., Martins, M., Barbosa, A., Bellotti, G. 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. **2**: 101-6.

Informe de Proyecto de Grupo Fonacit G: 2005000827. 2009. Análisis de factores de riesgo asociados a la persistencia d focos endémicos de la Enfermedad de Chagas en los Estados Portuguesa, Guárico y sucre: identificación molecular de determinantes de virulencia y blancos potenciales para una quimioterapia racional. Instituto de Medicina Tropical, Faculatad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Lages-Silva, E., Ramírez, L., Pedrosa, A., Crema, E., Pena, S., Macedo, A., Chiari, E. y colaboradores. 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signature of *Trypanosoma cruzi* II in strains from patients with differential clinical forms of Chagas´ disease Brazil. *J. Clin. Microbiol*. **44**: 2167-2171.

Lambrech, F. 1965. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas´ disease. *Rev. Int. Med Trop São Paulo*. **7**: 346-352.

Lenzi, H., Oliveira, D., Lima, M., Gattass, C., 1996. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol* **84**:16–27.

Lisboa, C., Diezt, J., Baker, A., Russel, N., Jansen, A. M., 2000. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Río de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **95**: 445-452.

Macedo, A., Martins, M., Chiari, E., Pena, S. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. *Mol Bioch Parasitol*. **55**: 147-154.

Macedo, A., Pena, S. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today*. **14**: 119-123.

Macedo, A., Oliveira, R., Pena, S. 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp Rev Mol Med*. [Consultado: 20 de Octubre de 2008]. Disponible en: <http://www-ermmm.cbcu.cam.ac.uk/02004118h.htm>.

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

Magalhaes, J., Andrade, S., Sherlock, Y. 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **38**:23-8.

Machado, C., Ayala, F. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academic of Science USA*. **98**: 7396-7401.

Marcet, P., Duffy, J., Cardinal, M., Burgos, J., Lauricella, M., Levin MJ, Schijman, A. y colaboradores. 2006. PCR- based screening and lineage identification of *T. cruzi* directly from fecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*. **132**: 57-65.

Mazzotti, L., 1940. Triatomineos de México y su infección natural por *Trypanosoma cruzi*. *Chagas Med (Mex)*. **20**:95.

Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct starin-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Barzil. *Trans Rev Soc Trop Med Hyg*. **71**: 217-25.

Miles, M., Cedillos, R., Povoá, M., Souza, A., de Prata, A., Macedo, V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form Chagas' disease. *Lancet*. **1**:1338-40.

Momen, H. 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **94**: 181-184.

Morel, C., Chiari, E., Camargo, E., Mattei, D.M., Romanha, A.J., Simpson, L., 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*. **77**: 6810-14.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic from a small number of individual. *Genetics*. **89**: 583- 590.

Pena, S., Barreto, G., Vago, A., de Marco, L., Reinach, F., Dias-Nieto, E. 1994. Secuence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **91**: 1946-9.

Phillips, N. 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material, and of the origin and course of infection in the vector. *Ann Trop Med Parasitol*. **54**: 397-414.

Pinto Dias, J.C., 2000. Epidemiología. In: *Trypanosoma cruzi* e doença do Chagas. Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. 2ª Edição. Rio de Janeiro, Brazil.

Pires, S., Da Rocha, W., Freitas, J., Oliveira, L., Kitten, G., Machado, C., Pena, S. y colaboradores. 2007. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int J. Parasitol*. **10**: 1016.

Pizzi, T., Wallace, A., Villagra, R., Muñoz, S., Ortiz, S., Solari, A. 2005. Concordancia de Lesiones histológicas ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Rev. Med. Chile*. **133**: 432-438.

Postan, M., McDaniel, J., Dvorak, J. 1984. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell isolated stocks. *Am J Trop Med Hyg*. **33**: 235-8.

Risso, M., Garbarino, G., Mocetti, E., Campetella, E., González Cappa, S., Buscaglia, C., Leguizamón, S. 2003. Differential Expression of a Virulence Factor, the *trans*-Sialidase, by the Main *Trypanosoma cruzi* Phylogenetic Lineages. *J. Inf. Diseases*. **189**:2250–2259.

Silva Valladares, H., Pimenta, J., de Freitas, J., Duffi, T., Machado, C., Pena, S., Macedo, A. y colaboradores. 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J. Parasitol*. **38**: 839-850.

Souto, R., Zingales, B. 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. **62**: 45-52.

Souto, R., fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., Zingales, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. **83**: 141-152.

Tanowitz, H., Kirchhoff, L., Simon, D., Morris, A., Weiss, L., Wittner, M. 1992. Chagas disease. *Clin Microbiol Rev.* **5**: 400-19.

Tibayrenc, M., Ayala, F. 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* **42**:277–292.

Tibayrenc, M., 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**: 47-115.

Toledo, M., de Lana, M., Carneiro, M., Bahia, M., 2002. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* **100**: 161-172.

Vago, A., Macedo, A., Oliveira, R., Andrade, L., Chiari, E., Glavão, L. 1996. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol.* **149**: 2153-9.

Vago, A., Andrade, L., Leite, A., d Avila, D., Macedo, A., Adad, S., Tostes, J. y colaboradores. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**: 1805-1809.

Vianna, G. 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **3**: 276-93.

Wright, D., Manos, M. 1990. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis, M.A., White, T.J. (Eds.), *A Guide to Methods and Applications: PCR Protocols.* Academic Press, New York, USA.

Zeledon, R., y Rabinovich, J. 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insecto vector. *Annu Rev. Entomol.* **26**: 101-33.

REFERENCIAS EN LÍNEA

R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

World Health Organization, 1991. Control of Chagas Disease. Technical reports. Ser N° 811.95. [Consulta: 15 de Octubre de 2008]

World Health Organization, 2002. Available from <<http://www.who.int/>> [Consulta: 15 de Octubre de 2008]

www.dndi.org.br/Imagens/mapa_doenca_chagas.jpg. [Consulta: 07 de Noviembre de 2008].

www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/420831-fn1#fn1; [Consulta: 30 de Septiembre de 2009].