

Análisis de la composición poblacional de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* I, provenientes de un hospedador humano, un insecto triatomineo y un reservorio natural

Denisse Ugueto León ^{1,2}, Anny Pomenta Rojas ^{1,2}, Hernán J. Carrasco ^{1,*}

Recibido: 7 Septiembre 2009; Aceptado: 18 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

Se analizó la composición poblacional de aislados venezolanos pertenecientes al grupo TcI, provenientes de distintos hospedadores. El análisis fue realizado mediante la clonación de los aislados utilizando la técnica de plaqueo, de la cual se originaron clones de cada uno que posteriormente fueron comparados mediante la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD). La observación de los perfiles de bandas obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa, mostró diferencias en cuanto el número y la posición de bandas en los clones obtenidos de los aislados provenientes de humano y del reservorio natural (*Didelphis marsupialis*), mientras que para el aislado proveniente del vector (*Triatoma nigromaculata*), todos los clones generaron perfiles de bandas similares. Estos resultados evidencian una heterogeneidad poblacional para el caso de los dos primeros aislados. El índice de variabilidad genética fue diferente para cada uno de los aislados, siendo mayor para dos aislados provenientes de dos pacientes chagásicos, mostrando un valor de 0.1652 y 0.0853 respectivamente, mientras que para el aislado proveniente del reservorio natural, se obtuvo un valor de 0.0312. Estos resultados indican el polimorfismo existente entre clones provenientes de un mismo aislado, siendo indicativo de la existencia de heterogeneidad intrapoblacional, lo cual pudiese tener implicaciones en la diversidad de manifestaciones clínicas reportadas para infecciones con *T. cruzi* I.

Palabras clave: *T. cruzi*, polimorfismo genético, heterogeneidad poblacional, enfermedad de Chagas.

Analysis of the population composition of venezuelans isolates of *trypanosoma cruzi* I from a human host, a triatomine insect and a natural reservoir

SUMMARY

It was analyzed the population composition of Venezuelan isolates belonging to the genotype TcI from different hosts. The analysis was carried out through the cloning of the isolates using the plating technique, obtaining clones of each one of them, which were afterward compared using the random amplified polymorphic DNA technique (RAPD). The observation of bands' profiles obtained by agarose gel electrophoresis, showed differences regarding to the number and position of the bands between the isolates from both humans and natural reservoir (*Didelphis marsupialis*), except for the clones obtained from the vector isolate (*Triatoma nigromaculata*), where all of them gave the same pattern of bands. This result reveals the presence of population heterogeneity for the isolates from human and natural host. The genetic variability index was different in each one of the isolates, being higher for the isolates from two chagasic patients, showing values of 0.1652 and 0.0853 respectively; and for the isolate from the natural reservoir the index value was 0.0312. These results reveals the presence of polymorphism between the clones obtained from the same isolate, showing the existence of intra-population heterogeneity, which might have implications on the diversity of clinical manifestations previously reported with *T. cruzi* I infections.

Keywords: *T. cruzi*, genetic polymorphism, population heterogeneity, Chagas disease.

* Solicitar copia a: henan.carrasco@ucv.ve.

1. Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Instituto de Medicina Tropical Dr. Felix Pifano.UCV.

2. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Trypanosoma cruzi es un protozoario hemoflagelado, perteneciente al orden kinetoplastida, que involucra dentro de su ciclo de vida a una amplia variedad de vertebrados (mamíferos domésticos y silvestres incluyendo el hombre) e invertebrados (insectos *Triatominae*), causante de la enfermedad de Chagas, la cual fue descubierta en el año 1909 por Carlos Chagas. Dicha enfermedad se caracteriza por presentar un curso clínico variable, que por lo general se inicia con una fase aguda, para luego pasar a una fase crónica.

Numerosos estudios biológicos, bioquímicos y moleculares han mostrado que *T. cruzi* presenta una alta variabilidad a nivel genético (1-3). El estudio pionero en la determinación de distintos grupos de *T. cruzi*, fue basado en los perfiles de seis isoenzimas, que permitió una primera clasificación en Zimodemos, denominados Z1, Z2 y Z3 (4-6). Este estudio, seguido de otros análisis empleando técnicas moleculares como el análisis de genes ribosomales (ARNr) y de minixón, permitieron la descripción de dos linajes distintos y filogenéticamente distantes de *T. cruzi*, denominados *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), donde se asocia principalmente al ciclo doméstico el linaje I y al ciclo selvático el linaje II (7,89). De los dos grupos, TcI es considerado hasta los momentos como un grupo homogéneo, mientras que TcII presenta a su vez cinco subgrupos que van desde (II a-e). En la actualidad existen otras técnicas moleculares para el estudio genético de *T. cruzi*, como lo son la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) (9). A partir de esta clasificación, diversos estudios han sido orientados a tratar de correlacionar la diversidad genética del parásito con sus características biológicas (10). De igual manera se han planteado correlaciones entre subpoblaciones del parásito y el éxito de la infección en mamíferos silvestres, en hospederos y en la ecología que el mismo abarca (11).

En Venezuela, un estudio realizado por Añez y col. (12), reveló un mayor número de pacientes infectados con el grupo *T. cruzi* I. En infecciones experimentales, se ha encontrado que el grupo al que pertenecen los parásitos determinan el tropismo a los tejidos, la parasitemia y la patogénesis de la enfermedad (9,13,14).

En la presente investigación, teniendo como base el conocimiento actualmente existente sobre la heterogeneidad poblacional de *T. cruzi*, nos propusimos estudiar la composición poblacional de tres aislados venezolanos pertenecientes al grupo TcI, provenientes de distintos hospedadores involucrados en el ciclo de vida del parásito, el hombre, un mamífero silvestre reservorio del parásito en la

naturaleza (*Didelphys marsupiales*) y de *Triatoma nigromaculata*, insecto Triatomo vector del parásito, con el objetivo de conocer si existe heterogeneidad intra-poblacional dentro de dichos aislados y por ende dentro del grupo TcI. Para lograr esto, se utilizó la técnica de plaqueo, según el protocolo descrito por Yeo y col (15) y la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), para realizar la comparación intrapoblacional por medio del análisis de patrones de bandas originados por cada uno de los clones derivados de cada aislado.

La determinación de variabilidad genética intra-poblacional en aislados de *T. cruzi* I, puede tener gran significancia en el desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas en el hombre, constituyéndose el presente estudio en un aporte para tratar de explicar la diversidad con la que las mismas se presentan. Es de hacer notar que aun después de tanto tiempo de haber sido descubierto este parásito, existan grandes interrogantes sobre el comportamiento del mismo y los factores que determinan el curso de la infección en humanos.

Materiales y Métodos

El origen de los parásitos incluidos en este estudio se muestra en la tabla I. Estos aislados provenientes de humano, mamífero silvestre y triatomo fueron suministrados por el criobanco del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, del Instituto de Medicina Tropical Dr. Felix Pifano. Sin embargo el procedimiento inicial para su obtención desde distintos hospedadores y el vector, fue mediante xenodiagnóstico indirecto con la sangre del paciente, hemocultivo de sangre cardiaca del mamífero silvestre *D. marsupialis* y de sangre obtenida de un ratón previamente infectado con las heces extraídas por disección del intestino del insecto naturalmente infectado. Los parásitos se mantuvieron en un medio de cultivo bifásico a 26°C Agar-Sangre (agar, 10% sangre defibrinada de conejo; 0,89 solución salina estéril suplementada con 50 mg/ml gentamicina), siendo revisados cada dos días, hasta observar un crecimiento óptimo de los parásitos. Finalmente, se analizaron cuatro aislados, dos provenientes de humano, uno de *D. marsupialis* (rabipelado) y otro de un insecto vector *Triatoma nigromaculata* (Tabla 1).

Clonación de aislados

Técnica de plaqueo

La técnica de plaqueo tiene como fin el aislamiento de colonias de *T. cruzi*, las cuales cada una se originan a partir de una sola célula o parásito, en placas de agar-sangre fortificado. La misma consta de dos fases, una fase semisólida en la cual va a estar contenida una suspensión de parásitos en un número conocido de un aislado en específico, constituida por el medio RPMI, antibióticos, agarosa de bajo punto de fusión (LPM) al

3% y medio de cultivo; y una capa sólida constituida por agar sangre, sales y una mezcla de antibióticos, esta última con el fin de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento de los parásitos. La fase semisólida va a ser vertida sobre la fase sólida, garantizando la expansión de la misma por toda la superficie con el fin de que los parásitos se dispersen de forma homogénea y así obtener colonias aisladas que van a corresponder a los clones que fueron empleados para el estudio.

Tabla 1. Origen de los aislados incluidos en el estudio.

Aislado	Genotipo	Hospedador	Localidad	Año
X12914	TcI	Humano	Miranda	2005
X10968	TcI	Humano	Sucre	2002
DMJ0108	TcI	Marsupial (<i>Didelphys marsupialis</i>)	Portuguesa	2008
VE46708	TcI	Vector (<i>Triatoma nigromaculata</i>)	Miranda	2008

Transplante de colonias

Las colonias individuales se obtuvieron de las placas, con una punta de pipeta estéril y se trasladaron a tubos de agar sangre con solución salina al 0.9%, siendo transferidos luego de su crecimiento a medio líquido RPMI enriquecido. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta observar un crecimiento importante de los mismos en fase exponencial y se utilizó un volumen equivalente a 20×10^6 epimastigotes/ml, para posteriormente ser sometidos a la extracción de ADN, según el método reportado por el protocolo de Williams y col. (16), modificado por Carrasco y col. (17). Se utilizó el kit de extracción Nucleon BA CC2 Extraction Purification Amersham Life Science®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cuantificación de DNA

Para la cuantificación de DNA de cada muestra, se realizó una dilución 1/10 en agua MiliQ y se determinó su absorbancia a través de un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000, considerando una relación de absorbancia 260/280 nm entre 1,8 y 2,3 como indicador de pureza óptimo tomando en cuenta 1 unidad de D.O. es equivalente a 50µg DNA/ ml de solución ($1U.A_{260} = 50\mu\text{g/ml ADN}$).

Caracterización genética de los clones

Los clones y los aislados originales fueron sometidos a la técnica de Amplificación aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD). La reacción de ampliación se desarrolló según el método reportado por el protocolo de Williams y col. (16), modificado por Carrasco y col. (17). Para ello se utilizó una

mezcla de reacción de 20 µl, que contenía 0,2mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), 20 pg de oligonucleótido; 1,0 unidad de Taq DNA polimerasa (Stratagene, La Jolla, C.A); 5ng de DNA genómico; 1,5 mM $MgCl_2$; 50mM KCL; 10 mM Tris- HCL (pH8,8). Para la amplificación se utilizaron los siguientes iniciadores o primers de British Bio- technology Products Ltd (Oxon, United Kingdom):

A1 (5'-TCACGATGCA-3')

A2 (5'-GAAACGGGTG-3')

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 minutos; 30°C por 2 minutos; 72°C por un minuto (una vez); 94°C por 30 segundos; 40°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (32 veces), con una extensión final a 72°C por 5 minutos. El control negativo de la reacción incluyó todos los componentes con excepción del DNA molde o muestra, el cual se sustituyó por agua Milli Q estéril.

La separación de los productos de amplificación se realizó con una electroforesis en gel de agarosa (Ultra pura) al 2,5%, a 80 V por 90 minutos. Las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Cada corrida electroforética incluía las cepas de referencia que se observan en la Tabla 2 y el marcador de peso molecular. Finalmente se obtuvo un registro fotográfico de los productos amplificados, por medio de una cámara Kodak® y se transfirió a un sistema computarizado Kodak®.

Tabla 2. Cepas de referencia.

Cepa	Origen	Zymodemo	Principal
WA250 cl 10b	Humano	Z1 (TcI)	
Esmerado cl2	Humano	Z2 (TcIIb)	
CAN II	Humano	Z3 (TcIIa)	

Análisis estadístico

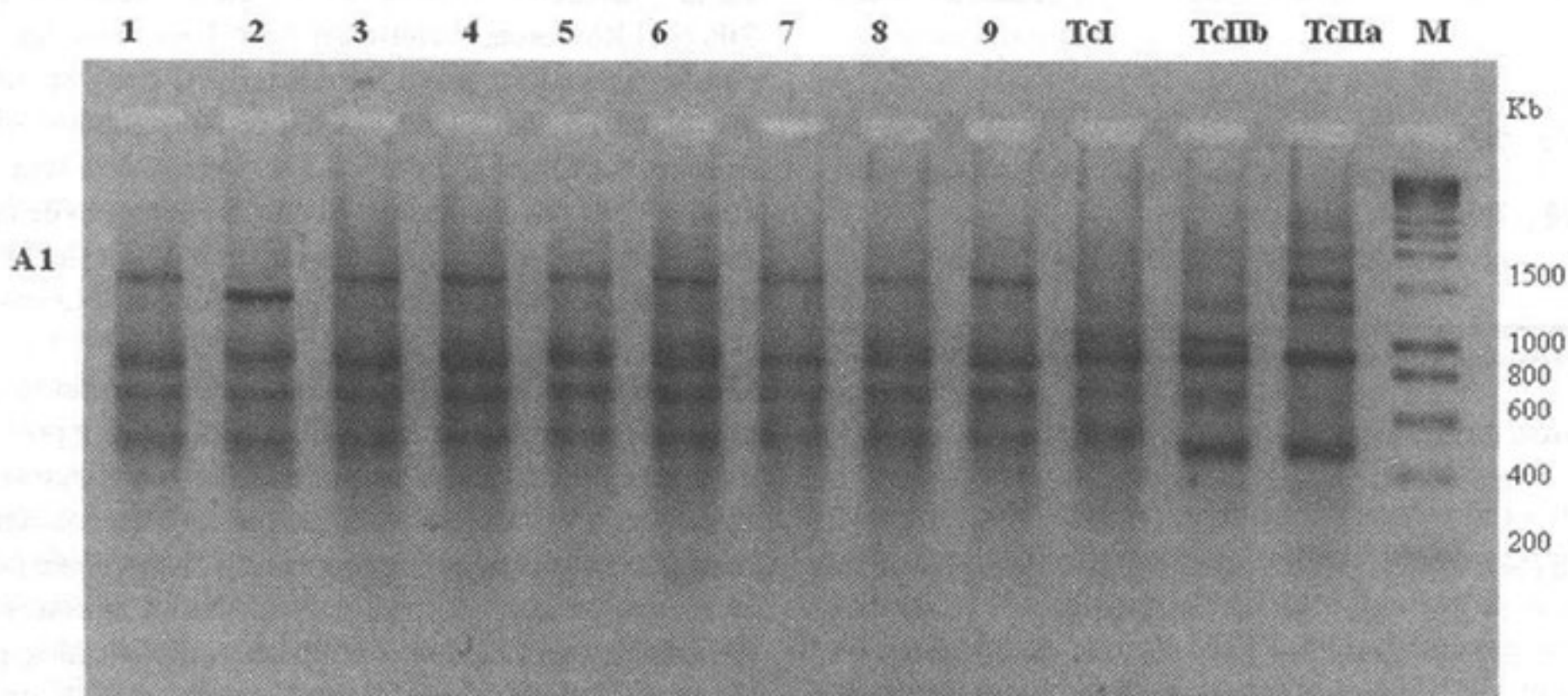
Los resultados se analizaron través del programa estadístico Popgene versión 1.31 de análisis de genética de poblaciones. Para ello se construyeron matrices de tipo uno cero, según la presencia o ausencia de bandas respectivamente. El programa generó los índices y valores que adelante se expresaran.

Resultados

La comparación de los perfiles de RAPD entre los clones provenientes de cada aislado, mostró diferencias en cuanto al número y posición de las bandas. Este es el caso de los aislados provenientes de humano X12914 (Figura 1 y 2) y X10968,

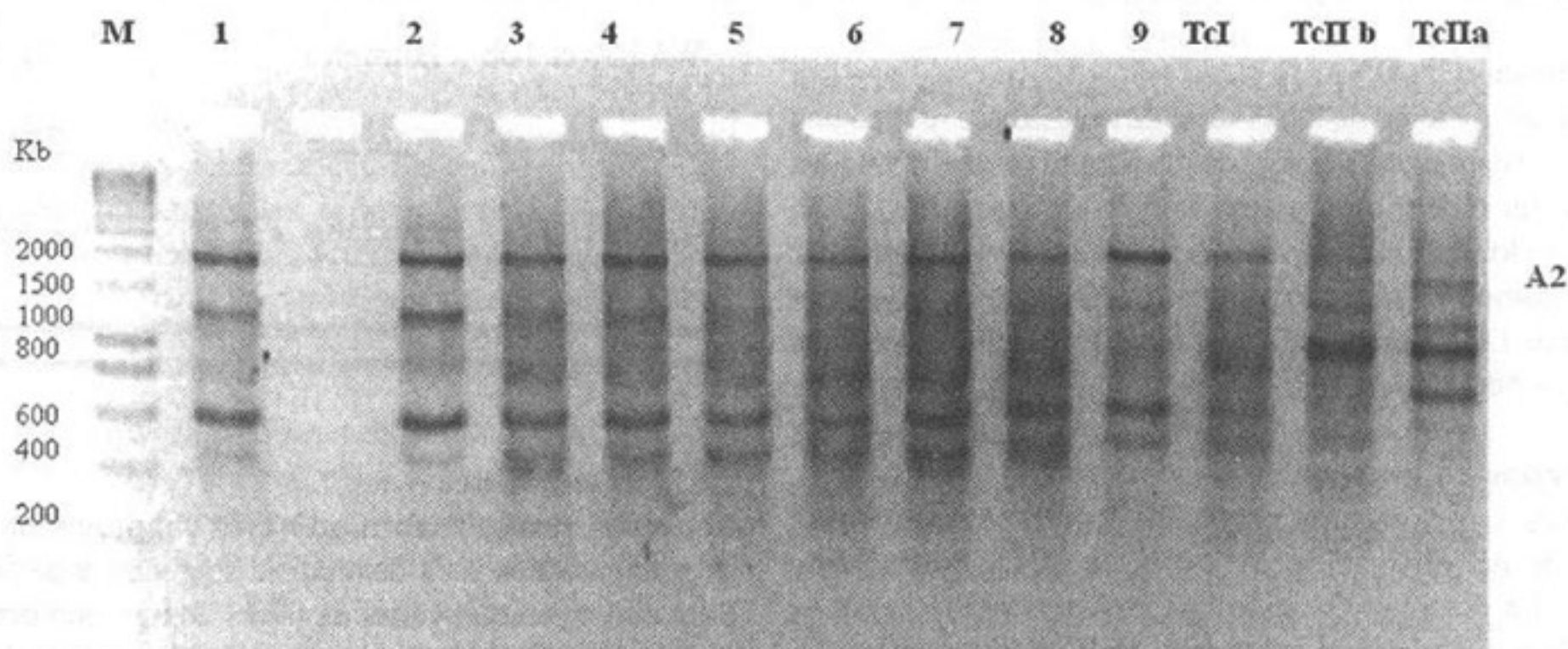
(Figura 3 y 4) igualmente el aislado DMJ0108 (Figura 5 y 6) no siendo así, para el VE46708 (Figura 7 y 8). Esto se observa en los índices de variabilidad genética, proyectados por el programa Popgene versión 1.31, éste permite el análisis de variación genética entre poblaciones naturales utilizando rasgos de dominancia y co-dominancia.

Figura 1. Perfil de bandas obtenido con el primer A1 para el aislado X12914 y los clones derivados de este. El carril 1 corresponde al aislado original; a partir de los carriles 2 hasta el 9 se observan los perfiles de bandas de los clones obtenidos de este aislado, así como las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa, indicados en el gel. En el último carril se muestra el marcador de peso molecular Hiperlader I.



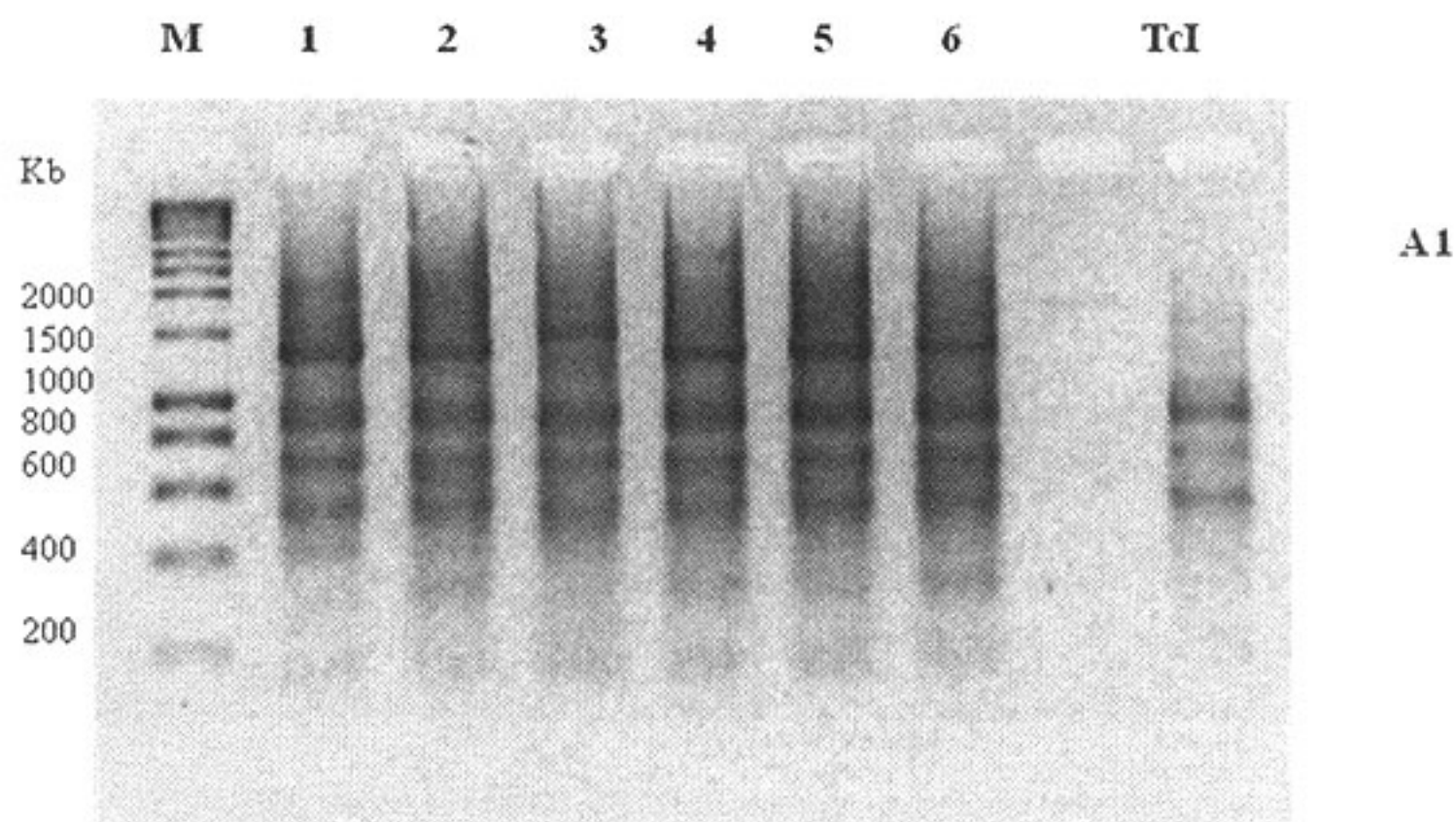
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X12914 con el primer A1.

Figura 2. Perfil de bandas obtenido para el aislado X12914, con el primer A2. El carril designado como M, muestra el perfil de banda correspondiente al marcador de peso molecular (Hiperlader I). El carril 1 corresponde al aislado original, a partir del cual se derivan los clones estudiados, cuyos perfiles de bandas se encuentran ubicados desde el carril 2 hasta el 9. Los últimos tres carriles corresponden a la cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa respectivamente.



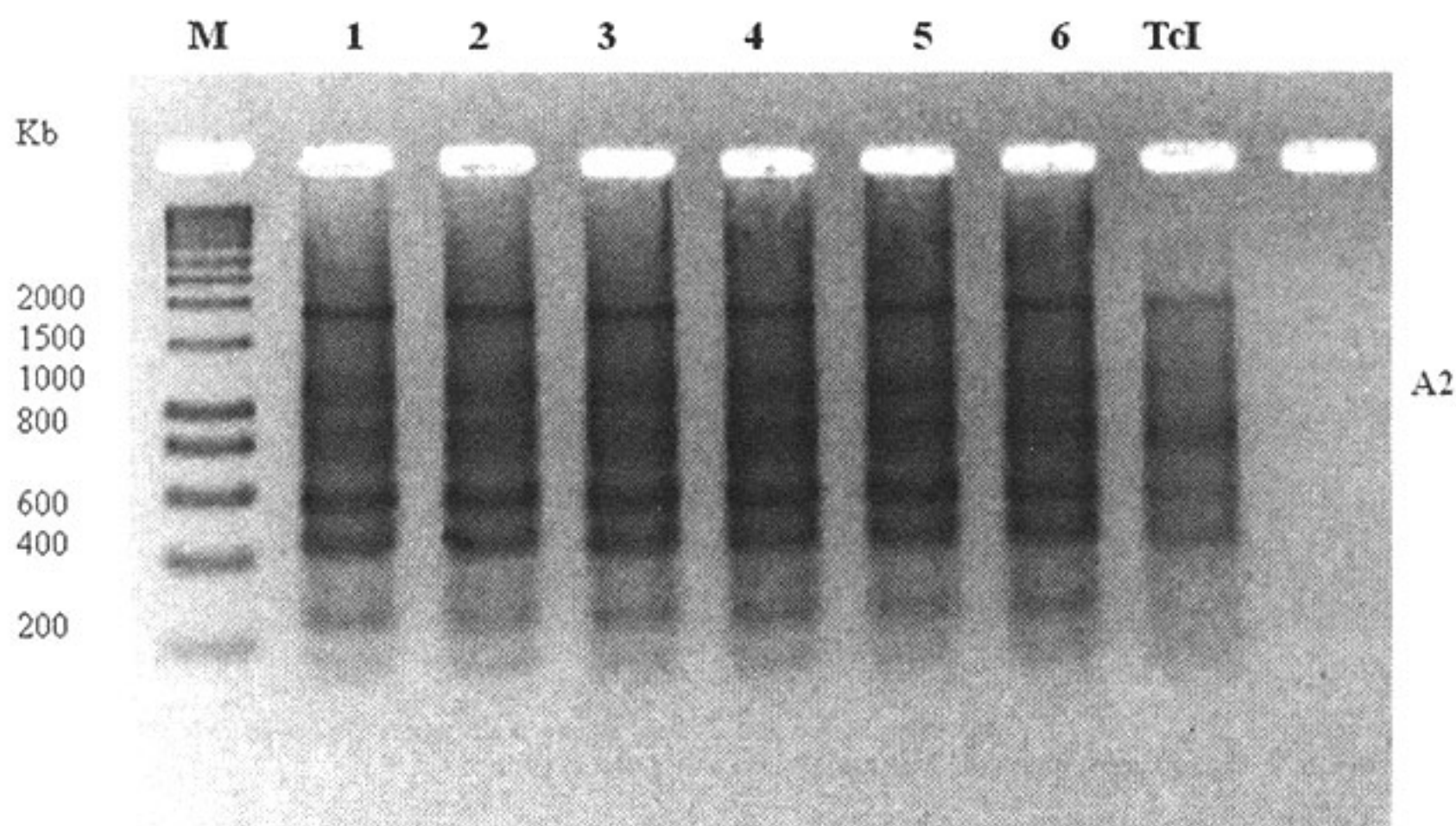
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X12914 con el primer A2

Figura 3. Perfil de bandas correspondiente al aislado X10968 con el primer A1. El primer carril M corresponde al marcador de peso molecular Hiperlader I. El carril 1 corresponde al aislado original. En los carriles del 2 hasta el 6 se encuentran ubicados los clones en estudio. El último carril corresponde a la cepa de referencia TcI.



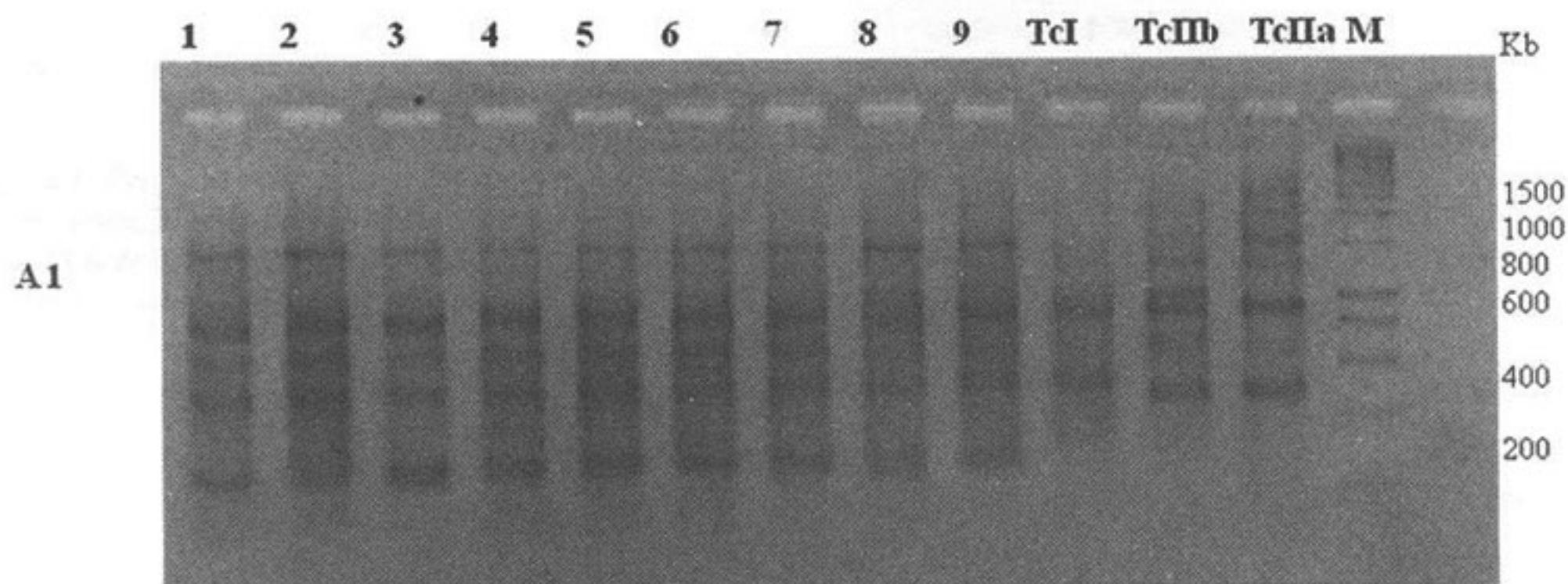
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X10968 con el primer A1

Figura 4. Perfil de bandas que corresponde al aislado X10968 con el primer A2. En el carril M se muestra el marcador de peso molecular Hiperlader I. El aislado original se encuentra en el carril 1; a partir de este se encuentran los clones derivados del mismo hasta el carril 6. En el último carril se encuentra la cepa de referencia TcI.



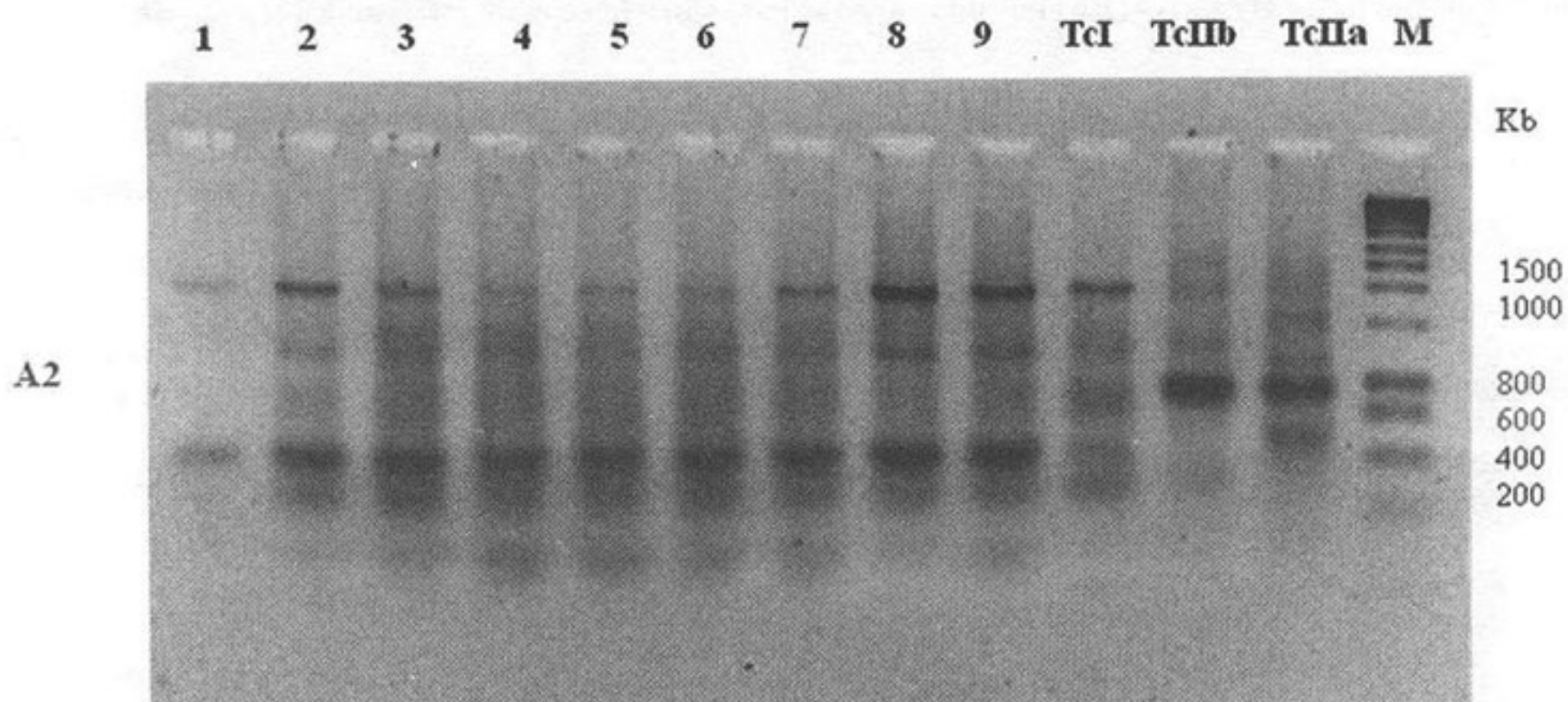
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X10968 con el primer A2

Figura 5. Perfil de bandas correspondiente al aislado DMJ0108 con el primer A1. En el carril 1 se localiza el aislado original de donde se obtienen los clones ubicados en el gel desde el carril 2 hasta el 9. Seguidamente se observan las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa. En el último carril encuentra el marcador de peso molecular.



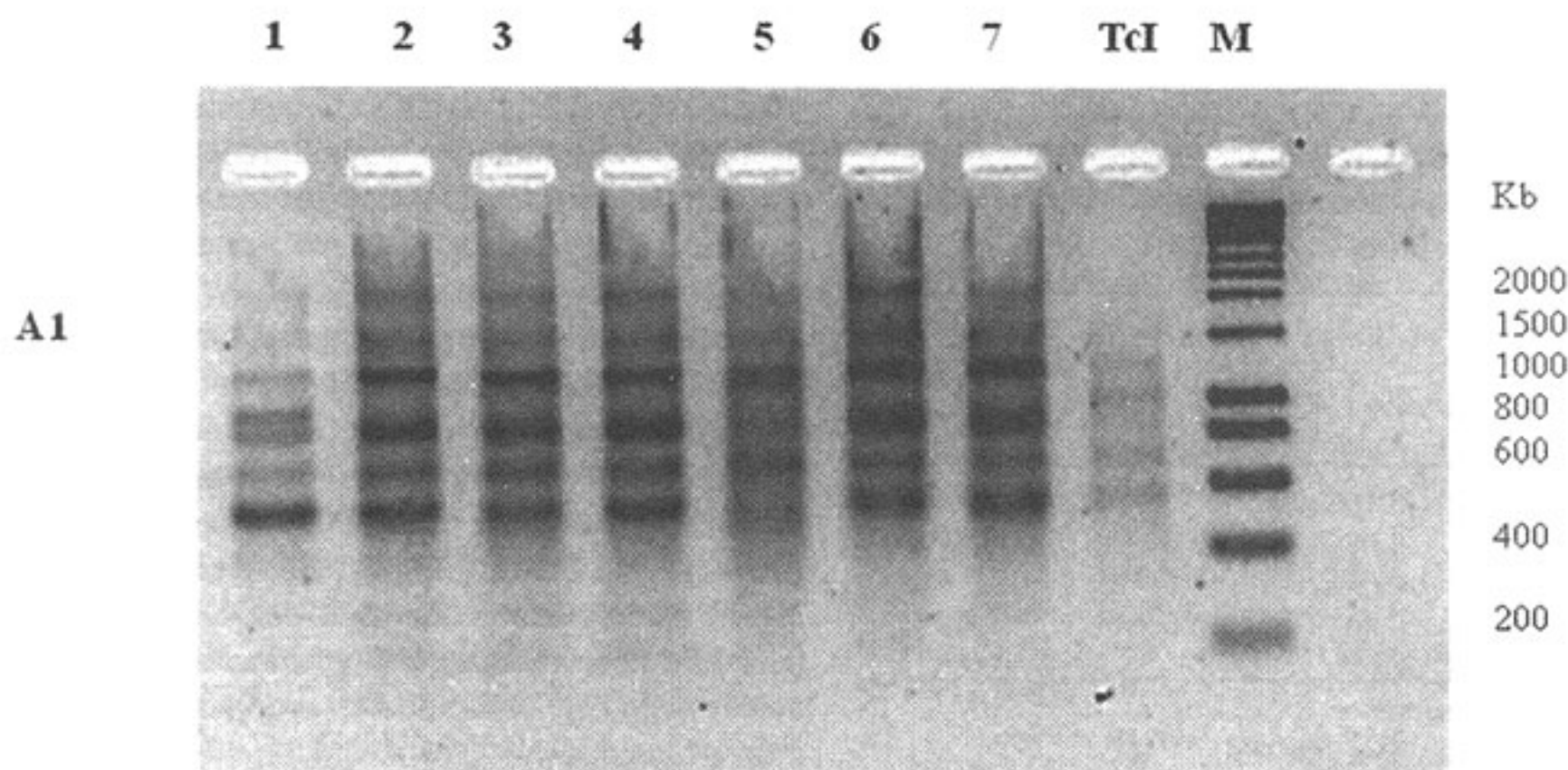
Productos de amplificación de aislado proveniente de Marsupial: DMJ0108 con el primer A1

Figura 6. Perfil de bandas correspondiente al aislado DMJ0108 con el primer A2. En el carril 1 se encuentra el aislado original, a partir de allí se ubican los clones que van desde el carril 2 hasta el 9. Las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa se encuentran seguidas de los mismos. En el último carril se ubica el marcador de peso molecular (Hiperlader I).



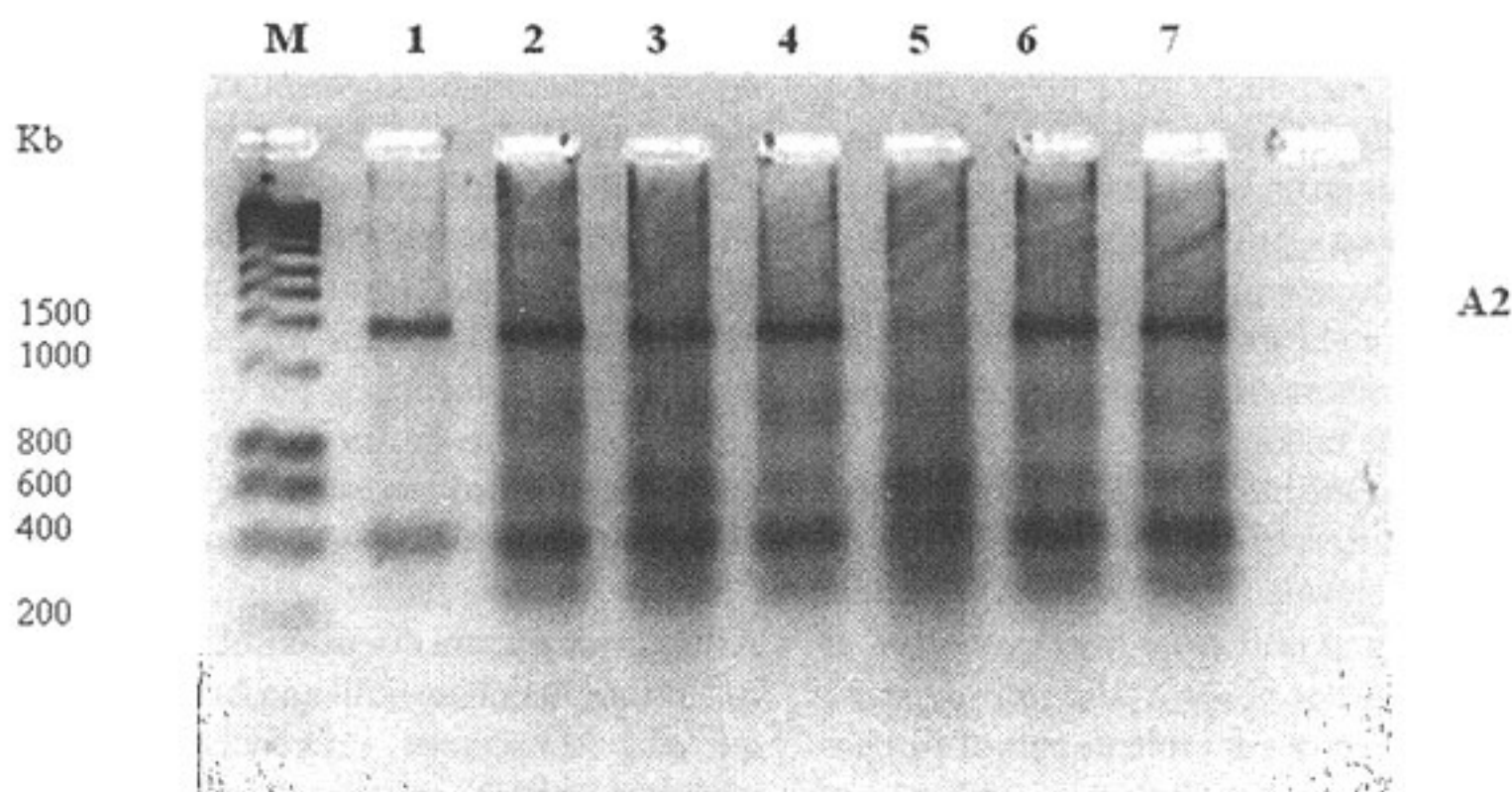
Productos de amplificación de aislado proveniente de Marsupial: DMJ0108 con el primer A2

Figura 7. Perfil de bandas correspondiente al aislado VE46708 con el primer A1. En el primer carril se ubica el aislado original y a partir de este hasta el carril 7 se ubican los clones originados del mismo. Luego se encuentra la cepa de referencia TcI, y en el último carril se localiza el marcador de peso molecular (Hiperlader I).



Productos de amplificación de aislado proveniente de Vector: VE46708: con el primer A1

Figura 8. Perfil de bandas correspondiente al aislado VE46708 con el primer A2. El carril designado con la M corresponde al marcador de peso molecular (Hiperlader I). En el carril 1 se ubica el aislado original, luego desde el carril 2 hasta el carril 7 se encuentran los clones derivados de este.



Productos de amplificación de aislado proveniente de Vector: VE46708: con el primer A2

Inicialmente, a través de la observación de geles se buscaron bandas bien definidas para establecer un criterio, que permitiese la elaboración de una matriz de datos de tipo 1-0, este paso es necesario para utilizar el programa estadístico Popgene versión 1.31. Los resultados generaron una variedad de índices para cada uno de los aislados (Tabla 3), que se

definen a continuación: (na) correspondiente al número de alelos observados, este indica la existencia de un alelo único, o mas de uno dependiendo de su valor. (h) índice de Variabilidad Genética de Nei's, el cual representa la probabilidad de que un locus con dos alelos elegidos al azar dentro de una población, sean diferentes el uno del otro. En

esta investigación fue un marcador importante, ya que fue el indicador de la variabilidad genética intra-poblacional en los aislados. Por último el programa expresa el Número de loci polimórficos que difieren entre individuos de una misma población y el porcentaje que esto representa. Todos estos índices estadísticos en conjunto fueron analizados, en búsqueda de la variabilidad genética dentro de cada aislado.

Tabla 3. Resumen estadístico de los índices de variabilidad genética para cada aislado.

Aislado	Media de na	Media de h	Número de Loci Polimórficos	Porcentaje de Loci Polimórficos
X12914	1.5000	0.1652	7	50.0%
X10968	1.2667	0.0853	4	26,67%
DMJ0108	1.0833	0.0312	1	8.33%
VE46708	1.0000	0.0000	0	0%

na= número de alelos observados

h= índice de variabilidad genética de Nei's.

Discusión

La base de esta investigación fue la clonación de los aislados mediante la técnica de plaqueo descrita por Yeo y col., (15). A pesar de que no existen muchos trabajos que respalden la utilidad de la misma, ésta logro ser efectiva ya que permitió la obtención de colonias perfectamente aisladas, fácilmente observables y en número suficiente para el estudio. La eficiencia de la técnica de plaqueo se extiende a la capacidad de sostenimiento de la colonia en un lapso de tiempo suficiente, para que ésta logre crecer hasta ser diferenciada con facilidad, además tiene la ventaja de ser relativamente sencilla y económica. Por otra parte, en la aplicación de la técnica de RAPD, se emplearon dos primers A1 y A2, esto con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar variabilidad entre el genoma de los clones de un mismo aislado. Dichos primers amplificaron fragmentos correspondientes a sitios de unión en donde encontraron complementariedad, según la secuencia de cada uno. Esta técnica permitió amplificar zonas en el genoma de *T. cruzi* en las cuales se observó polimorfismo entre los locus, lo que hizo a esta técnica conveniente para el estudio.

Visto esto, podemos decir que para el fin que perseguía la investigación, fue favorable no solo la aplicación de las técnicas de plaqueo y la de RAPD, sino su combinación, como lo hicieron Yeo y col. (2007), ya que se pudo demostrar la heterogeneidad existente en clones de un mismo aislado de *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos demostraron la existencia de heterogeneidad intra-poblacional, sin embargo esta

variabilidad genética se presentó en diferente grado en cada uno de los aislados, mostrando una mayor variabilidad genética entre los clones pertenecientes a los aislados provenientes del hombre, lo cual podría atribuirse al resultado de la relación parásito hospedero y al ambiente adverso al que se somete el parásito cuando hace infección en el hombre, ya que éste debe vencer desde su entrada las barreras naturales y posteriormente evadir el sistema inmune del individuo para poder establecer con éxito la infección. Quizás estos factores puedan influenciar cambios a nivel genético, para poder adaptarse a esas condiciones que no le son favorables, pudiendo quizás con ello conseguir algún tipo de ventaja adaptativa. En este caso fueron estudiados dos aislados, los cuales presentaron variabilidad genética en una proporción distinta, siendo el aislado X12914 el mas polimórficos de los dos; resulta llamativo el hecho de que el 50% de sus loci mostraron ser polimórficos. Quizás la explicación a este resultado, pueda de alguna manera estar relacionado con la virulencia del aislado, pero ello debe corroborarse en otras investigaciones en las cuales se trabaje con modelos experimentales utilizando los clones obtenidos.

En cuanto a los clones provenientes de marsupial, aunque la variabilidad genética obtenida fue baja, no debe ser despreciada, es necesario dirigir estudios en este sentido, que tratasen de explicar si se esta presentando algún cambio de este reservorio en la naturaleza. A diferencia de los demás aislados, el proveniente del vector, no presento variación entre sus clones, mostrando un patrón de bandas homogéneos. Cabe destacar que esta homogeneidad a la que se hace referencia, esta sujeta al número de individuos comparados en este aislado y a los primers utilizados, ya que quizás no se detectaron con ellos regiones las cuales presentasen variabilidad, por lo cual no puede ser descartada la posibilidad de que exista heterogeneidad entre los mismos. También este resultado pudiese estar influenciado por el origen del aislado, ya que el mismo proviene de un vector netamente silvestre, que probablemente no haya estado en contacto jamás con otro ciclo de transmisión y/o hospedador vertebrado.

A lo largo de nuestra discusión, el termino variabilidad genética ha sido ampliamente utilizado, sin embargo debemos conocer que cuando hacemos referencia al término de variabilidad genética, se hace enfoque a variaciones en la secuencia del genoma, por lo tanto en un amplio sentido el concepto de variabilidad se hace sinónimo de polimorfismo. Hoy en día este último es definido como la existencia simultanea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado. El polimorfismo afecta tanto regiones codificantes del genoma (polimorfismo génico) como no codificantes (polimorfismo general). En ambos casos puede ocurrir una variación en un par de bases, como en miles de pares de bases. La variabilidad genética puede ser el resultado

de un proceso de selección, mutación, migración y deriva genética. Sin embargo el polimorfismo resultante, podría tener distinta trascendencia desde el punto de vista funcional, dependiendo de si afecta a regiones no codificantes, reguladores o codificantes del genoma de *T. cruzi* y también del modo en que pueda afectar al mensaje genético de estas últimas (18). Bajo este concepto se podrían establecer hipótesis que tratasen de explicar el efecto que podría tener la heterogeneidad poblacional encontrada sobre el parásito y la relación que establece éste con su hospedero.

Estos resultados podrían ser altamente significativos, pero necesariamente deben ser sometidos a posteriores estudios que puedan sustentar la significancia de los mismos. Evidentemente, existe una variabilidad genética entre los clones derivados de un mismo aislado, pero a este nivel solo podemos limitarnos a reportar su existencia. Este podría ser el punto de partida para la realización de nuevos trabajos que pudieran relacionar estos datos con las implicaciones clínicas, epidemiológicas y biológicas del parásito propiamente dicho. Existen muchas interrogantes que no han sido esclarecidas en cuanto a la clínica de la enfermedad de Chagas y se piensa que podrían estar relacionadas con esta heterogeneidad en general que presenta el parásito, ya que algunos estudios han reportado tropismo diferencial de las cepas por los tejidos cuando el hospedero se infecta (1,9,19). Sería interesante saber si este tropismo se haya relacionado a la heterogeneidad de un aislado, sin excluir los factores genéticos intrínsecos al hospedador. También pudiesen hacerse futuras correlaciones entre la severidad en la que se puede presentar la enfermedad en diferentes individuos cuando se hayan infectados por un mismo aislado y la heterogeneidad encontrada en los clones. Estas interrogantes que surgen a partir de lo observado en este estudio, tiene como base la diferente proporción en la que se presenta heterogeneidad dependiendo del origen de los aislados estudiados.

Agradecimientos

Estudio financiado con fondos de FONACIT proyecto G-2005000827.

Referencias

1. Macedo A, Pena S. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today* 1998;14:119-124.
2. Macedo A, Pimienta J, Aguilar R, Melo A, Chiari E, Zingales, *et al.*: Usefulness of Microsatellite Typing in population Genetic Studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Oswaldo Cruz* 2001; 96:407.
3. Devera R, Fernandes O, Coura J. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting populations after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:1-12.

4. Miles M, Toye P, Oswald S, Godfrey D. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71:217-225.
5. Miles M, Souza A, Pova M, Shaw J, Lainson R, Toye P. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978; 272:819-821.
6. Miles M, Lanham S, De Souza A, Pavao D. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74: 221- 242.
7. Souto R, Fernandes O, Macedo A, Campbell D, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83:141-152.
8. Zingales B, Stolf B, Souto R, Fernandes O, Briones M. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:159-164.
9. Macedo A, Machado C, Oliveira R, Pena S. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2004; 99:1-12.
10. Guzmán E, Zaval J, Acosta K, Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomed* 1999;10:177-184.
11. Rojas M, Pinho A, Cuervo P, Alfaro F, Solano M, Samata X, *et al.* *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae): Ecology of transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology* 2006;114 305-313.
12. Añez N, Crisante G, Da Silva F, Rojas A, Carrasco H, Umezawa E, *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop. Med. Ins. Health* 2004; 9: 1319-1326.
13. Andrade, S. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94:185-187.
14. Magalhaes I, Souza M, Lima C, Andrade S. Infections of *Calomys* (Rodentia Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotypes: Pathogenicity, Histotropism, and fibrosis induction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:403-13.
15. Yeo M, Lewis M, Carraco H, Acosta N, Llewellyn M, Da Silva Valente S, *et al.* Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *International Journal for Parasitology* 2007; 37:111-120.
16. Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski A, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990;18: 6531-6535.
17. Carrasco H, Frame I, Valente S, Miles M. Genetic Exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 54(4): 418-424.
18. Luque J, Herraez A. *Biología Molecular e Ingeniería genética*. Harcourt España, 2001. pag.469.
19. Mejías A, Triana O. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomedica* 2005; 25:76-66.