



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO MOLECULAR DE AISLADOS
MEXICANOS DE *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A:
VERÓNICA RAMOS MEJÍA

México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Hernández Montes Homero.
Vocal	Prof. Gutiérrez Ramos Abel.
Secretario	Prof. Espinoza Gutiérrez Bertha.
1er. suplente	Prof. Astigarraga Zavaleta Maite.
2do. suplente	Prof. Aguilar Ramírez Manuel Benigno.


Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.
U.N.A.M., México. / Laboratorio de Genética Molecular de Parásitos y Vectores,
Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo y Cooperación,
ORSTOM, Francia.

Asesor


Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Sustentante


Verónica Ramos Mejía



A quien más podría dedicar ésta tesis que a mis padres.
A Boli con todo mi inexpresable cariño
y a papá, que seguro estaría feliz de verla.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Bertha Espinoza por la dirección de éste trabajo, el apoyo y consejos.

Al Dr. Michel Tibayrenc y a todas las personas del laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs, del centro de investigación ORSTOM en Montpellier, principalmente a Christian Barnabé y Brigitte Bastrenta, que contribuyeron a la realización de éste trabajo.

Al destino, suerte o a lo que se deba que halla encontrado magníficas personas, que le han dado sabor a mi vida universitaria:

Mis compañeritos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. En el laboratorio Norma Espinosa, Normita, Vicky, Alf, Lulú (Hi de Ho para los cuates) y Salvador . Y de laboratorios vecinos Claudita, Martha, Isabel y Julio César.

Los cuates que por latosos, listos y solidarios hicieron de la generación QFB'89 algo muy especial: Euclides (con sus n sobrenombres), Agustín, Mónica, Pili, Lupita, Karl, Ricardo, Paty, Susy, Martha, Dea, Liz, Luis, mi tocaya Vero A., Gustavo, Carmen, Omar e Irmita.

Mis amigos de la facultad: Ginita, Angélica, Sandra, Mónica, Jesús, David, Miguel, Rosa y Eduardo.

Claus, que por estar dentro de todos los grupos anteriores, merece un renglón aparte.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y a la Dirección General de Intercambio Académico de la UNAM por el apoyo económico recibido en la realización de ésta trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
I.1. El parásito.	2
I.1.1. Características generales de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
I.1.2. Posición taxonómica.	3
I.1.3. Ciclo de vida.	4
I.1.4. Metabolismo en <i>T.cruzi</i> .	5
I.2. La enfermedad de Chagas.	9
I.2.1. Aspectos clínicos.	9
I.2.2. Posibles mecanismos de patogénesis.	10
I.2.3. Aspectos epidemiológicos.	12
I.3. Heterogeneidad de <i>T.cruzi</i> .	15
I.4. Análisis isoenzimático.	16
I.5. Análisis de ADN polimórfico.	22
II. OBJETIVOS.	24
III. MATERIAL Y METODOS.	25
III.1. Material biológico.	25
III.1.1. Cultivo de parásitos.	25
III.2. Análisis isoenzimático.	25
III.2.1. Preparación de extractos isoenzimáticos.	25
III.2.2. Sistemas enzimáticos estudiados.	25
III.2.3. Electroforesis en acetato de celulosa.	27
III.2.4. Revelación de las placas.	27
III.2.5. Interpretación de resultados.	27
III.3. Análisis de ADN polimórfico (RAPD).	28
III.3.1. Extracción de ADN.	28
III.3.1.a. Lisis de las células y digestión.	28
III.3.1.b. Desproteínización.	28
III.3.1.c. Precipitación del ADN.	29
III.3.2. Amplificación.	29
III.3.3. Electroforesis sobre gel de agarosa.	30
III.3.4. Lectura de los geles.	30
III.4. Métodos de análisis de resultados.	31

IV. RESULTADOS.	32
IV.1. Análisis isoenzimático.	32
IV.2. Análisis por RAPD.	40
V. DISCUSION.	47
VI. CONCLUSIONES.	53
VII. BIBLIOGRAFIA.	54
ANEXO I.	60
ANEXO II.	62
ANEXO III.	65
ANEXO IV.	66

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es un problema de salud importante en América Latina. Su agente etiológico, el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, muestra un polimorfismo genético considerable que se ha demostrado en estudios de ADN total, digestión del ADN del cinetoplasto y patrones isoenzimáticos. Dicha variabilidad genética está relacionada con propiedades del parásitos de importancia médica como virulencia y resistencia a fármacos, además entre sus diferentes cepas y aislados muestra gran heterogeneidad en características biológicas como tropismo celular, infectividad, patogenicidad y crecimiento *in vitro*. Debido al poco conocimiento de los aislados mexicanos del parásito y a la gran heterogeneidad que éste presenta, se realizó el estudio de 18 aislados mexicanos con el propósito de caracterizarlos a nivel molecular, mediante dos técnicas diferentes, el análisis de isoenzimas y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico, 18 aislados mexicanos. Empleando las dos técnicas se observó homogeneidad entre los aislados mexicanos, con excepción del aislado C4, del estado de Jalisco, que apareció más relacionado con las cepas sudamericanas usadas como referencia. Por otro lado, no se encontró correlación entre los datos genéticos obtenidos por este estudio y la información previa que se tenía de los aislados, como origen y comportamiento biológico *in vitro* (p.ej. crecimiento, infectividad y virulencia).

I. INTRODUCCIÓN.

"Venimos, desde meses, estudiando el ciclo evolutivo de un hemoflagelado, el *trypanosoma Cruzi*, que tiene por hospedero intermediario un hematófago..." Así es como comienza uno de los dos reportes preliminares donde, en 1909, Carlos Justiano Chagas describe una nueva enfermedad humana. En ese mismo año escribe un tercer reporte donde aparecen completas todas sus observaciones realizadas hasta ese momento sobre la enfermedad que es conocida en nuestros días como enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la cual es una enfermedad parasitaria que afecta a millones de personas en Latinoamérica, y como la mayoría de las enfermedades parasitarias, esta ligada a la pobreza (Lewinsohn, 1979; Moncayo, 1992).

El descubrimiento de la enfermedad es único ya que fue el mismo Carlos Chagas quien descubrió el agente etiológico, el vector y la enfermedad en un periodo de solo dos años. La secuencia de sus observaciones fue la inversa a la que se sigue clásicamente, ya que primero encontró al vector y al reservorio, después el microorganismo causal y finalmente describió la enfermedad en humanos, y aunque él describió la fase aguda de la enfermedad no dudo en suponer que la enfermedad tenía también una fase crónica (Lewinsohn, 1979).

Su agente etiológico es un protozooario parásito flagelado, llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual tiene un ciclo de vida complejo en el que intervienen como reservorios distintos vertebrados, y como transmisores insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, principalmente del género *Triatoma*.

I.1. El parásito.

I.1.1. Características generales de *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi es un parásito pleomórfico que presenta la mayoría de los organelos existentes en células eucariotas como un núcleo, retículo endoplásmico, ribosomas, peroxisomas, lisosomas, aparato de Golgi y una sola mitocondria, lineal en el caso de los tripomastigotes y ramificada en los otros estadios, que contiene al cinetoplasto (Pereira, 1990). El primer ADN extranuclear que se encontró fue el que se localiza en la mitocondria de los tripanosomátidos, puede constituir el 20% o más del ADN total, que se encuentra en el cinetoplasto (Vickerman, 1976) y cuenta con dos

componentes: el maxicírculo, con los genes mitocondriales, y el minicírculo, cuya función no se conoce todavía (Pollard et.al., 1990).

Como los cromosomas del parásito no se condensan durante la división nuclear no se sabe el número de cromosomas que tiene, pero estudios realizados por Wagner y So sugieren que tiene por lo menos 10 cromosomas, tampoco es conocida la ploidia del parásito pero existen evidencias de que es un organismo diploide (Tibayrenc et.al., 1984).

Los tripanosomas poseen un citoesqueleto formado por una particular estructura de microtúbulos que le confieren rigidez, y que se encuentra debajo de la membrana plasmática, excepto en la región de la bolsa flagelar donde el parásito toma por pinocitosis proteínas y otras moléculas que requiere (Seebeck, Hemphill y Lawson, 1990; Pereira, 1990; Cazzulo, 1992a). Cuentan con un flagelo único que emerge de su porción anterior en la bolsa flagelar, que actúa como un organelo de locomoción y de adhesión a superficies celulares tanto del vector como del hospedero mamífero (Seebeck, Hemphill y Lawson, 1990).

1.1.2. Posición taxonómica : (WHO, 1986)

Reino	Protista.
Subreino	Protozoa.
Phylum	Sarcomastigophora.
Subphylum	Mastigophora.
Clase	Zoomastigophorea.
Orden	Kinetoplastida.
Suborden	Trypanosomatina.
Familia	Trypanosomatidae.
Género	<i>Trypanosoma</i> .
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i> .
Especie	<i>Trypanosoma (S.) cruzi</i> .

1.1.3. Ciclo de vida.

Durante su ciclo de vida el parásito sufre varios cambios morfológicos que incluyen cambios en su tamaño, forma y posición del cinetoplasto relativa al núcleo. Son tres los estadios del parásito que se distinguen:

1) Tripomastigote.- Estadío no replicativo, de aproximadamente 20 - 25 μ de largo y 2 μ de ancho (las dimensiones son variables según el aislado), presenta el cinetoplasto posterior al núcleo y un flagelo en la parte anterior del parásito, adherido a una membrana ondulante que confiere al parásito una gran movilidad que lo caracteriza. En huéspedes mamíferos se encuentra intracelularmente en tejidos o extracelularmente en circulación, y en transmisores triatómicos se encuentra extracelularmente en el intestino posterior.

Se distinguen 2 tipos de tripomastigotes: tripomastigotes sanguíneos que provienen de amastigotes y se encuentran en circulación sanguínea de mamíferos infectados, y tripomastigotes metacíclicos, que son los que se encuentran en los transmisores invertebrados (se considera que una infección comienza en mamíferos y termina en el insecto transmisor, donde se cierra el ciclo).

2) Amastigote.- De forma redondeada con dimensión aproximada de 2-3.5 μ , tiene un pequeño flagelo que no se encuentra libre. Se encuentra intracelular en tejidos del mamífero infectado, replicándose por fisión binaria.

3) Epimastigote.- Forma flagelada de aproximadamente 20 μ de longitud que presenta el cinetoplasto anterior al núcleo, el cual es central y muy prominente. Es el estadio del parásito que se multiplica en el intestino medio del transmisor y que da lugar al tripomastigote metacíclico, también es la forma que se tiene comúnmente en cultivo en los laboratorios.

El mecanismo clásico de la infección se da cuando el triatómico portador del parásito pica al mamífero para alimentarse de su sangre y, al ingerir grandes cantidades de ésta vacía su contenido intestinal, en donde se encuentra el parásito en forma de tripomastigote metacíclico altamente infectivo que penetra al mamífero atravesando mucosas y piel erosionada. Dentro del organismo los tripomastigotes se encuentran en circulación y pueden penetrar a una gran cantidad de células, donde se transforman en amastigotes y comienzan a multiplicarse; una vez que la célula se encuentra llena de parásitos, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes y rompen

la célula, saliendo entonces a circulación para diseminarse e invadir nuevas células. El ciclo se cierra cuando un triatómino pica al mamífero infectado y adquiere al parásito junto con la sangre ingerida, el parásito se transforma en epimastigote y se multiplica en el intestino medio del insecto. Después de 3 o 4 semanas algunos epimastigotes que han pasado al recto del triatómino se adhieren a la pared rectal y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados en la heces (Hudson y Britten, 1985; Santos y Acosta, 1992).

La segunda vía más frecuente de transmisión del parásito es la transfusión sanguínea. Se han reportado otros mecanismos por los que se puede dar la infección como el trasplante de órganos infectados, la ingesta de bebidas y alimentos contaminados con materia fecal de triatóminos, la ingestión de carne parasitada semicruda o de triatóminos infectados, por el contacto directo con materia fecal infectada que contamine ropa o utensilios domésticos y por arrojados de laboratorio. También puede haber transmisión de la madre infectada a sus hijos vía transplacentaria o a través de la leche materna (Goldsmith et al., 1978; Velasco et al., 1992; WHO, 1991; Brabin, 1993).

1.1.4. Metabolismo en *T. cruzi*.

Las diferentes formas del parásito cuentan cualitativamente con características metabólicas similares (Cazzulo, 1992a). *T. cruzi* es capaz de utilizar carbohidratos y aminoácidos como fuente de energía sin cambios drásticos en los niveles de enzimas catabólicas (Urbina, 1994). Estudios en epimastigotes demuestran que si se encuentran en un medio que contenga tanto carbohidratos como aminoácidos, consumen primero los carbohidratos, a pesar de que el intestino de las chinches vectoras (que constituye su ambiente natural) es pobre en carbohidratos y rico en proteínas y aminoácidos. En la fase exponencial del cultivo de epimastigotes es preferida la glucosa pero cerca de la fase estacionaria se consumen mejor los aminoácidos. Cultivos axénicos de células tipo amastigote (formas extracelulares) son exclusivamente glicolíticos, mientras que los tripomastigotes metacíclicos parecen no tener un catabolismo glicolítico, derivando toda su energía de proteínas y aminoácidos (Cazzulo, 1992a).

El parásito parece no tener reservas de polisacáridos, por lo que los carbohidratos deben de ser tomados constantemente (Cazzulo, 1992a). Sin embargo tiene gran capacidad de tomar y

almacenar proteínas exógenas en organelos llamados reservomas, que son moviizados en estado de estres nutricional (Urbina, 1994) y puede usar proteínas propias en circunstancias especiales como en la transformación epimastigote-tripomastigote (Cazzulo, 1992a).

CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

La degradación de los carbohidratos por los tripanosomas es incompleta aún en presencia de oxígeno, a pesar de que cuenta con las enzimas para la oxidación completa de los carbohidratos como son las enzimas glicolíticas, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria (Cazzulo, 1992a; Urbina, 1994).

Tabla 1. Productos finales del catabolismo de carbohidratos por *T. cruzi*

Estadio del parásito	Condiciones experimentales	Productos
Tripomastigote sanguíneo	Aerobiosis	CO ₂ , succinato, acetato, L-lactato.
	Anaerobiosis	Succinato, acetato, L-lactato.
Epimastigote	Aerobiosis	CO ₂ , succinato, L-alanina, L-malato, acetato.
	Anaerobiosis	Succinato, L-alanina, Acetato.

Tomado de Cazzulo, 1992b.

A este proceso se la conoce como "fermentación aerobia", ya que se liberan al medio productos de fermentación aunque el parásito se halle en presencia de oxígeno (Cazzulo, 1992b; Urbina, 1994). En medio de cultivo el parásito usa inicialmente rápida e incompletamente los carbohidratos, pero la biomasa aumenta preferencialmente después que se ha depletado la fuente de carbohidratos (Urbina, 1994).

Una característica importante en el metabolismo de *T. cruzi* es la ausencia del "efecto Pasteur", que es la inhibición de la glicólisis por el oxígeno. En éste parásito la utilización de la glucosa es menor en condiciones anaeróbicas (Cazzulo, 1992b). La glicólisis no es regulada de la manera clásica, que es a través de las enzimas hexosacinasasa y fosfofructocinasasa. El único punto de control que se ha encontrado es la fuerte activación de la piruvatocinasasa por la fructosa 2,6-bis-fosfato, que es capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio de concentraciones milimolares de Pi y

ATP(Cazzulo, 1992a). La vía de las pentosas parece ser activa en epimastigotes (Cazzulo, 1992a).

T.cruzi cuenta con microcuerpos llamados glicosomas que se constituyen de una sola membrana permeable y que miden de 0.1 a 0.25µm en epimastigotes fijados (Taylor y Guttridge, 1987). Estos glicosomas contienen la mayoría de las enzimas glicolíticas.

La reoxidación del NADH es esencial para el funcionamiento de la vía glicolítica; su oxidación por la cadena respiratoria no es suficiente ya que se excretan productos de fermentación en presencia de oxígeno. La alta producción de succinato es la manera que tiene el parásito de reoxidar el NADH (Cazzulo, 1992a). El fosfoenolpiruvato (PEP) es un punto donde convergen dos rutas del metabolismo de *T.cruzi*; por un lado se produce de manera irreversible piruvato, que entra al ciclo de Krebs; y por el otro se produce de manera reversible oxaloacetato y ATP debido a la carboxilación del PEP por la enzima PEPcarboxinasa (PEPCK, enzima que se expresa de manera constitutiva), y que conduce seguramente a la producción de succinato. El sistema PEPCK/malato deshidrogenasa es seguramente un punto de reoxidación del NADH (figura 1) (Urbina, Osorno y Rojas, 1990; Urbina, 1994). El ácido 3-mercaptopicolínico (3MP), que es un potente inhibidor de la PEPCK, impide la producción de succinato y el consumo de glucosa, además bloquea el catabolismo de compuestos derivados de prolina por el ciclo de Krebs, lo que demuestra que PEPCK es esencial para la fermentación aerobia y anaerobia de la glucosa, así como para el catabolismo completo de los aminoácidos por el parásito (Urbina, Osorno y Rojas, 1990).

CATABOLISMO DE PROTEÍNAS

La utilización de proteínas y aminoácidos por el parásito es rápida y completa formando CO₂, productos biosintéticos y amonio sin aparente acumulación de intermediarios. Se ha propuesto que la PEPCK alimenta al ciclo de Krebs con aminoácidos para su catabolismo, regulado por una glutamato deshidrogenasa NAD⁺-dependiente (Urbina, 1994). Los epimastigotes cuentan con fuentes intracelulares de aminoácidos que se forman de L-alanina en un 50%, prolina, glicina y ácido glutámico principalmente. Aunque no se cuentan con muchos estudios se cree que los aminoácidos son oxidados por el parásito a través del ciclo de Krebs (Cazzulo, 1992a).

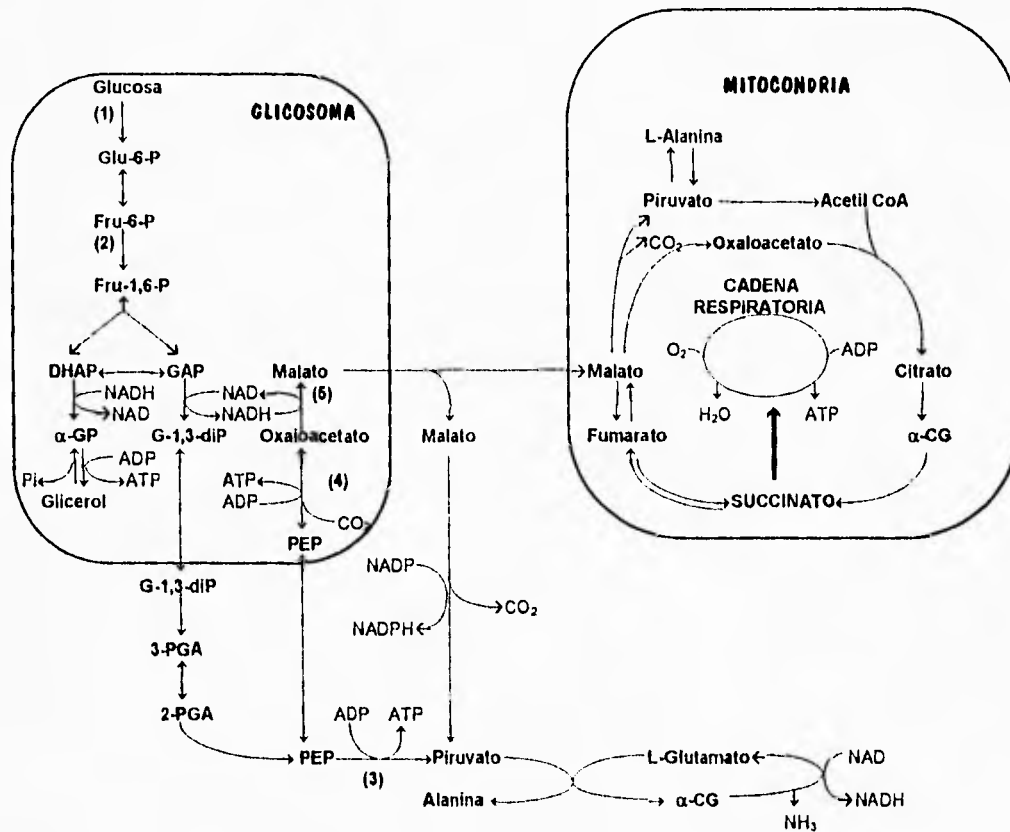


FIGURA 1. Modelo del metabolismo de *T. cruzi*. Todas las reacciones indicadas en el modelo han sido demostradas en el parásito. Enzimas que se mencionan en el texto: (1) hexosacinasasa, (2) fosfofructocinasasa, (3) piruvatocinasasa, (4) PEPCK y (5) malato deshidrogenasa. Tomado de Urbina, 1994.

I.2. La enfermedad de Chagas.

I.2.1. Aspectos clínicos.

La enfermedad muestra tres distintas fases en su desarrollo: una fase aguda, una fase indeterminada y una fase crónica.

Fase aguda.- Dura de 1 a 3 meses y puede ser asintomática o presentar sintomatología no específica como fiebres intermitentes, anorexia, vómito, diarrea, náuseas, linfadenopatías y hepatomegalia, que se presenta en un 30 - 40 % de los casos. Si la entrada del parásito fue cercana al ojo se puede presentar una aguda inflamación local indolora en la región periorbital del ojo llamada signo de Romana, o si es en otra región de la piel se puede presentar también inflamaciones indoloras nóduloeritematosas conocidas como chagomas de inoculación. Se encuentran también cardiopatías, los casos graves de miocarditis chagásica aguda pueden evolucionar hacia una insuficiencia y conducir a la muerte en cuestión de horas. Se llegan a presentar casos de meningoencefalitis. La mortalidad en la fase aguda es muy baja (menor al 10%) y se da generalmente en niños. En ésta fase se puede encontrar tripomastigotes en circulación sanguínea e incluso en líquido cerebroespinal. La disminución de la parasitemia se da al final de esta etapa hasta niveles no detectables gracias a una importante respuesta inmune mediada principalmente por anticuerpos anti-*T.cruzi* que pueden ser detectados desde la segunda o tercera semana de la infección (Hudson y Britten, 1985; Santos y Acosta, 1992).

Fase indeterminada.- Puede durar de 10 a 20 años. Parece haber desaparecido la enfermedad pues no hay sintomatología, pero la infección sigue latente con serología positiva. Estudios adecuados pueden detectar en algunos casos alteraciones electrocardiográficas (Hudson y Britten, 1985; Santos y Acosta, 1992).

Fase crónica.- Después del periodo de latencia la enfermedad puede volverse evidente presentando patologías de diversas intensidades, algunas realmente severas caracterizadas por trastornos cardíacos y gastrointestinales, como por ejemplo miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva y la formación de megaórganos, generalmente de esófago y colon; un 27% de los individuos en fase indeterminada desarrollan síntomas cardíacos, 6% daño en el sistema digestivo y un 3% presentan alteraciones en el sistema nervioso periférico (Moncayo, 1992).

Los síndromes cardíacos son provocados por un proceso inflamatorio progresivo con infiltración linfocitaria y fibrosis que disminuyen la capacidad de difusión de oxígeno y la conductividad eléctrica por fibras cardíacas. Los síndromes gastrointestinales son relacionados con la disfunción motora de los segmentos del esófago y colon debido a la denervación parasimpática, frecuentemente del plexo de Auerbach, que produce alteraciones en los movimientos peristálticos. La mortalidad es variable de acuerdo a la gravedad de la patología presentada, pero es común la muerte por insuficiencia cardíaca (Hudson y Britten, 1985; Tanowitz et.al., 1992; Santos y Acosta, 1992)

1.2.2. Posibles mecanismos de patogénesis.

En la fase aguda de la enfermedad, la típica reacción inflamatoria se puede observar sólo después de la destrucción de células infectadas (Hudson y Britten, 1985), el daño correlaciona con la presencia de parásitos. En los sitios donde se desarrolla el parásito se encuentran infiltrados de células inflamatorias. Hay una proliferación masiva de células B y T, lo que provoca se depletan varios compartimentos linfoides y se observe inmunosupresión en la fase aguda (Petry y Eisen, 1989; Hudson y Britten, 1985). Algunas poblaciones de linfocitos T y macrófagos podrían ser los responsables del efecto supresor (Kierszenbaum, Rodríguez de Cuna y Szein, 1989; Cerrone y Kuhn, 1991). La disminución en la producción de IL-2 es importante en el fenómeno de inmunosupresión (Kierszenbaum, Rodríguez de Cuna y Szein, 1989).

En la fase crónica de la enfermedad se encuentra daño en los tejidos en ausencia de parásitos. Cuatro teorías principales se han propuesto para explicar la patología que se observa:

- 1.- Toxinas producidas por *T. cruzi*, que son liberadas al romperse la célula que contiene al parásito, dañan las células musculares y neuronas adyacentes, no parasitadas. La neurotoxina actúa sobre células ganglionares parasimpáticas destruyendo la inervación parasimpática del corazón.

Esta teoría no tiene mucha aceptación debido principalmente a que no explica la ausencia de parásitos en las lesiones y a que muchos corazones chagásicos no presentan denervación (Miles, 1983; Hudson y Britten, 1985; Santos y Acosta, 1992).

2.- Daños producidos durante la fase aguda repercuten en la patología observada en la fase crónica. Los amastigotes alteran la homeostasis de la célula huésped como la diferenciación de mioblastos a miotubos, ya que mioblastos infectados no forman miotubos ni sintetizan ARNm para la cadena pesada de miosina y la α -actina (Morris et.al., 1991), se observan también alteraciones en la regulación del Ca^{2+} , generación de inositol trifosfato (IP3), síntesis de la prostaglandina I_2 , y alteración en el metabolismo del AMPc (Morris et.al.,1992). Como el daño no correlaciona con el grado de parasitismo se propone que unas pocas células infectadas pueden afectar a muchas células normales vía la matriz extracelular (MEC), la cual actúa como un sistema de comunicación celular a través de hormonas y citocinas (Morris et.al., 1991; Tanowitz et.al.,1992). En la infección de células endoteliales se observa un incremento en la producción de IL-1 β (interleucina 1), IL-6 y CSF-1 (Factor estimulador de colonias 1), que provocan el reclutamiento de leucocitos (CSF-1 e IL-1 β), coagulación (IL-1 β) y proliferación de células de músculo liso (IL-1 β e IL-6), que juntos conducen al espasmo microvascular coronario y la trombosis que se observan en la cardiomiopatía chagásica (Tanowitz et.al., 1992).

3.- Antígenos liberados por el parásito después de la ruptura de la célula hospedera y por la lisis de parásitos circulantes por el sistema inmune, son adsorbidos en la superficie de células no infectadas, que despierta una agresiva reacción inmunológica contra células del huésped, destruyéndose células propias y liberando antígenos que pueden producir respuestas autoinmunes (Miles, 1983; Hudson y Britten, 1985).

4.- La existencia de antígenos de reacción cruzada entre el parásito y las células del hospedero que despiertan una respuesta autoinmune. En pacientes con enfermedad de Chagas crónica se han demostrado autoanticuerpos anti-EVI (antígenos endoteliales, vasculares e intersticiales), anti-laminina, anti-tejido nervioso, anti-antígenos cardiacos como la miosina y la desminina (Hudson y Britten,1985; Tanowitz, 1992; Santos y Acosta, 1992). También se ha demostrado la existencia de células T autorreactivas que al transferirse a ratones no infectados presentan reacciones autoinmunes de citotoxicidad en células de miocardio (Santos y Acosta, 1992).

1.2.3. Aspectos epidemiológicos.

La enfermedad se limita al Continente Americano y algunas Islas del Caribe encontrándose entre latitudes 42N y 46S, desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, principalmente en regiones tropicales o subtropicales. Se calcula que existen de 16 a 18 millones de personas infectada en Latinoamérica, lo que representa un 4% de la población total, en algunas zonas la prevalencia es de hasta 75%; además existen unos 90 millones en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 1991; Moncayo, 1992).

De los distintos mecanismos de transmisión del parásito se estima que un 80% es debido al vector triatómino, 16% vía transfusión de sangre infectada, 2% transmisión congénita y el 1% restante las otras vías de transmisión (WHO, 1991). Es importante el hecho que las hemotransfusiones sean la segunda vía de transmisión de la enfermedad, ya que se han encontrado casos de la enfermedad en zonas urbanas que no tienen las condiciones para transmisión clásica, debido a migraciones de poblaciones rurales y su papel como donadores, por lo que deberían realizarse controles contra *T. cruzi* en los bancos de sangre (Goldsmith et al., 1978).

Los casos de enfermedad de Chagas congénito son generalmente de madres en la fase asintomática de la enfermedad aunque no son raros los casos de madres en fase crónica. Se estima que de 0.7 a 10.5% hijos de madres seropositivas en fase crónica adquieren la enfermedad (Brabin, 1993). Los niños son generalmente prematuros, pequeños y de poco peso; la tasa de mortalidad es alta. Se pueden producir abortos (Santos y Acosta, 1992).

Los triatóminos transmisores están distribuidos sobre una vasta región del continente americano, desde Salt Lake City en E.U.A. hasta el desierto de patagonia. Son hemípteros de la familia *Reduviidae*, de la subfamilia de los *Triatominae*, del género *Triatoma*. Hematófagos estrictos con un ciclo de vida que parte de huevos, pasa por cinco estadios ninfales para llegar a adultos machos o hembras (Zeledon y Rabinovich, 1981; WHO, 1991).

Los nidos naturales de los triatóminos se sitúan en las proximidades de hogares de mamíferos, reptiles o aves. La luz les atrae y puede hacerles volar de un árbol vecino al interior de una casa (Miles, 1983).

TABLA 2. Prevalencia estimada e Incidencia de la enfermedad de Chagas en diferentes países de América Latina y principal especie de vector.

Pais	Población ,1990 (miles)	Seropositividad	Incidencia (4) casos/año	Principa vector
Argentina	32 322	2 640 000(1)	53 064	<i>T.infestans</i>
Belice	189	675(2)	26	<i>T.dimidiata</i>
Bolivia	7 314	500 000(1)	18 000	<i>T.infestans</i>
Brasil	150 368	6 340 000(1)	169 278	<i>T.infestans</i>
Chile	13 173	370 000(3)	8 103	<i>T.infestans</i>
Colombia	32 978	900 000(1)	21 690	<i>R.prolixus</i>
Costa Rica	3 015	130 000(1)	3 320	<i>T.dimidiata</i>
Ecuador	10 587	30 000(1)	891	<i>T.dimidiata</i>
El Salvador	5 252	322 000(1)	10 594	<i>R.prolixus</i>
Guatemala	9 197	730 000(1)	28 397	<i>R.prolixus</i>
Guiane fr.	70	1 000(2)	29	<i>R.prolixus</i>
Guyana	755	12 000(2)	307	<i>R.prolixus</i>
Honduras	5 138	300 000(1)	11 490	<i>R.prolixus</i>
México	81 250	1 614 000(2)	44 228	<i>T.barberii</i>
Nicaragua	3 871	67 000(2)	2 660	<i>R.prolixus</i>
Panamá	2 418	220 000(1)	5 346	<i>R.pallascens</i>
Paraguay	4 277	397 000(1)	14 054	<i>T.infestans</i>
Perú	21 550	643 000(1)	19 161	<i>T.infestans</i>
Surinam	364	6 000(2)	184	<i>R.prolixus</i>
Uruguay	3 094	37 000(1)	614	<i>T.infestans</i>
Venezuela	19 735	1 200 000(1)	34 440	<i>R.prolixus</i>
TOTAL	406 907	16 459 675	445 976	

Notas: (1) Valores estimados por la OMS.
(2) Valores estimados por los autores basados en la prevalencia en países vecinos.
(3) Valores estimados en Chile.
(4) Casos por año estimados usando el modelo de Hayes & Scofield (1990).
(Tomado del Reporte de la OMS, 1991)

Inicialmente la enfermedad de Chagas era una enzootia silvestre, pero el hombre invadió el ecosistema natural y tanto el transmisor como el parásito se adaptaron al hombre (Velasco, 1992). Los ciclos de transmisión pueden ser selváticos, peridomésticos o domésticos, dependiendo de la capacidad del triatómino de infestar habitaciones humanas y de los animales que actúen como reservorios. Se han reportado cerca de 100 especies de mamíferos que pueden ser infectadas por el parásito, entre los cuales encontramos animales domésticos como perros, gatos y ratas; animales peridomésticos como son chivos, caballos y cerdos; y silvestres como el armadillo, el tlacuache y diversos roedores (Miles, 1983; Velasco, 1992).

Los triatóminos pueden ser de hábitos puramente selváticos e incapaces de colonizar habitaciones humanas (aunque la chinche adulta puede volar a éstas), peridomésticos y domésticos. Las especies domésticas no colonizan indiscriminadamente todos los lugares de las casas; p.ej. *R.prolixus* coloniza particularmente techos de palma, lo cual es de esperarse si su ecotipo natural son las copas de las palmas, *P.megistus*, que tiene como ecotipo natural árboles huecos, coloniza principalmente casas de madera y paredes de adobe. Cuando el vector infesta los techos de las casas puede producirse una "lluvia" de heces infectadas sobre los habitantes de la casa, contaminando sus utensilios y alimentos (Miles, 1983; WHO, 1991).

Dentro de las especies domésticas son seis las que se distinguen por su importancia como transmisores de la enfermedad: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay; *Panstrongylus megistus* al este de Brasil; *Triatoma brasiliensis* al noreste de Brasil; *Rhodnius prolixus* es el principal vector en Colombia y Venezuela, se encuentra también en Ecuador y partes de Centroamérica como Guatemala, Honduras y El Salvador; *Triatoma dimidiata* en Colombia, Ecuador, norte de Perú y Centroamérica; y *Triatoma sordida* en el centro de Brasil, ciertas regiones de Paraguay y el noroeste de Argentina (WHO, 1991).

En México se han encontrado triatóminos infectados desde 0 a 2200 m sobre el nivel del mar, lo que abarca casi dos tercios del territorio nacional, por lo que se cree que la zona endémica de la enfermedad es muy amplia. De los vectores encontrados es el género *Triatoma*, con 22 especies y subespecies, el más ampliamente distribuido. En México las especies más importantes son *T.barberi*, *T.dimidiata*, *R.prolixus* y *T.phyllosoma*, considerando su distribución y

sus hábitos domiciliarios (Salazar, Arteaga y Uribarren, 1988; Velasco y col., 1991; Tay et.al., 1992).

No son muchos los datos que se tienen sobre la enfermedad en México, ya que afecta a la población rural que habita en poblados pequeños, algunas veces aislados, donde no hay servicios de salud o éstos son deficientes, y no se tienen los recursos para diagnósticos precisos, por lo que frecuentemente en enfermos chagásicos el diagnóstico es simplemente "cardiopatía", sin precisar el tipo de cardiopatía presentado ni la etiología (Reyes et.al., 1983). Por otro lado no existe coincidencia entre diferentes autores del número comprobado de enfermos de Chagas en México; Tay y colaboradores reportan que hasta 1991 se habían comprobado parasitológicamente 187 casos humanos de la enfermedad (Tay et.al., 1992), mientras que según Velasco hasta 1990 se habían identificado alrededor de 300 casos agudos, aproximadamente el mismo número de enfermos con cardiopatía chagásica y una docena de enfermos con megavíceras (Velasco, 1992). Encuestas seroepidemiológicas en regiones localizadas han mostrado porcentajes de seropositividad muy altos, por lo que se decidió llevar a cabo una Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) que mostró un nivel promedio muy bajo de seroprevalencia, un 0.2% positivos por las pruebas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta a una dilución confirmatoria de 1:32. Según la encuesta un 74.5% de los seropositivos fueron menores de 39 años, lo cual está dentro lo esperado ya que los pacientes chagásicos mueren alrededor de los 50 años. Se encontró prevalencia en niveles socioeconómicos bajos (Velasco et.al., 1991).

1.3. Heterogeneidad de *T.cruzi*.

Se han reportado diferencias geográficas en los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas, tanto en prevalencia como en severidad de la enfermedad; los "mega" síndromes que se observan en la fase crónica parecen estar confinados a ciertas áreas geográficas (Miles et.al., 1981). Lo anterior se ha atribuido a diferencias genéticas de susceptibilidad en los humanos, pero estudios en el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y tipificación isoenzimática de pacientes chagásicos en Brasil no muestran ninguna relación del genotipo con los aspectos clínicos de la enfermedad (Luquetti et.al., 1986). Por otra parte se ha propuesto que la heterogeneidad genética en *T.cruzi* puede ser uno de los factores que provoquen las diferencias

observadas en la enfermedad (Dvorak, 1984). Dicha heterogeneidad se ha reportado en diferentes características del parásito como crecimiento *in vitro*, contenido total de ADN, antigenicidad, infectividad a células *in vitro* (Dvorak, 1984), en la especificidad de anticuerpos monoclonales (Flint et.al., 1984; Snary, 1985), comportamiento en ratones (Miles, 1983), patrones en la digestión del ADN del cinetoplasto por endonucleasas (Tibayrenc et.al., 1986; Miles, 1983) y en la distribución de neuraminidasa activa entre diferentes aislados y clonas del parásito, donde se observó una alta actividad de neuraminidasa en cepas con tropismo al músculo esquelético (Pereira y Hoff, 1986). La observación que diferentes aislados del parásito producían una coloración diferente del medio en que se cultivaban llevó al estudio donde se encontraron diferencias en los niveles de Fe, Zn y K entre dos aislados de *T.cruzi* (Dvorak et.al., 1988). También se ha demostrado heterogeneidad en aislados mexicanos en estudios con fragmentos de restricción en genes de ARN ribosomal y en patrones de digestión de ADN con endonucleasas (Zavala, Velasco y Hernández, 1992), pudiéndose agrupar a las cepas con respecto a su origen geográfico. En otro estudio los mismos aislados mexicanos se analizaron en cuanto a su comportamiento biológico de crecimiento *in vitro*, transformación de epimastigotes a tripomastigotes *in vitro*, infectividad y virulencia, encontrándose aún más heterogeneidad (López, 1994). Sin embargo, algunos otros trabajos han reportado homogeneidad entre los aislados mexicanos de acuerdo a sus patrones isoenzimáticos (Ortega, 1980; Galván et.al., 1983).

1.4. Análisis isoenzimático.

A principios de 1970 se empezaron a usar enzimas metabólicas de parásitos protozoarios, p.ej. tripanosomas y *Leishmania*, como marcadores genéticos en estudios de epidemiología, biología básica, y taxonomía (Miles, 1983).

Las enzimas son producto de genes, por lo tanto se puede considerar que diferencias en la expresión de una determinada enzima entre dos organismos revela diferencias genéticas entre éstos. Por otro lado el valor de las enzimas como marcadores genéticos depende de su grado de estabilidad (Miles et.al., 1980).

Según Gutteridge y Rogerson *T.cruzi* se adapta a los cambios de medio ambiente, a que está expuesto en su ciclo de vida, debido a que tiene disponible todo el tiempo la maquinaria

metabólica que requiere para cada caso, ya que no existen diferencias cualitativas en las enzimas metabólicas de los tres principales estadios del parásito (citado en Bigliolo y Godfrey, 1987). Aunque no se han encontrado enzimas estadio-específicas, algunos perfiles isoenzimáticos si son específicos de un estadio del ciclo de vida de *T. cruzi* (Bogliolo y Godfrey, 1987).

En un estudio realizado por Bogliolo y Godfrey en 1987, los patrones isoenzimáticos de epimastigotes de *T. cruzi* (algunos clonados y otros no), cultivados en tres diferentes medios: 4N, LIT y NEM, permanecieron constantes; además dichos patrones no cambiaron después de 1 y 2 años de cultivo en LIT. Miles y colaboradores en 1980 encontraron que aislados no clonados de *T. cruzi* Z1 y Z2 después de 3 años de cultivo en 4 tipos de medios de cultivo diferentes permanecen estables en cuanto a sus características isoenzimáticas.

Sin embargo, también hay evidencias de que cultivos axénicos de aislados no clonados del parásito pueden presentar patrones isoenzimáticos variables, debido a la mezcla de poblaciones, pero después de un tiempo los patrones se estabilizan y permanecen constantes debido a la selección de poblaciones en el cultivo (Tibayrenc et al., 1986; Solari et al., 1992).

En el análisis isoenzimático se estudia la migración de enzimas en un campo eléctrico sobre un soporte como almidón, poliacrilamida, agarosa y acetato de celulosa. Después de la migración se revela la presencia de la proteína por medio de reacciones de coloración histoquímica. En el caso en el que la proteína estudiada sea una enzima, la reacción para su detección incluye al sustrato de la enzima acoplado con una técnica de coloración.

En la velocidad de migración de la proteína intervienen tres factores: el tamaño de la molécula, la forma de la molécula (efecto de filtro de las mallas del soporte de migración), y sobretodo, su carga eléctrica global. La carga eléctrica global es el resultado de las cargas individuales de los aminoácidos que forman a la proteína, por lo tanto es un reflejo de la estructura primaria de la proteína (Tibayrenc, 1979).

Se conoce como isoenzimas a aquellas enzimas que tienen la misma función enzimática, pero con diferente estructura, por lo que presentan una diferente movilidad electroforética. El análisis de isoenzimas pone en evidencia de manera indirecta variaciones en la estructura del genoma, ya que, diferencias en la migración de las enzimas se deben a diferencias en sus

estructuras primarias, y éstas diferencias son el resultado de variaciones en nucleótidos del gene que las codifica. Las isoenzimas multigénicas pueden ser alélicas o aloenzimas, esto es, isoenzimas codificadas por alelos diferentes de un gen (de un mismo locus), o no alélicas, isoenzimas codificadas por genes en dos locis diferentes (Tibayrenc, 1979). En el caso de *T.cruzi*, si asumimos que es diploide, podemos atribuir los patrones isoenzimáticos a alelos (Tibayrenc, 1988) (fig. 2).

Es importante definir el patrón isoenzimático que se lee en el gel de migración como zimograma (Abderrazak et al., 1993). Un zimograma puede ser producido por diferentes fondos genéticos. Cada isoenzima resulta de la acción de un gene propio. Por ejemplo un zimograma a dos bandas, que revela la existencia de dos isoenzimas, puede ser producto de dos genes situados en dos locis diferentes (isoenzimas unigénicas) en un organismo homocigoto para cada uno de estos genes; o por los alelos diferentes de un gen en un heterocigoto (alozimas) (fig. 2). Se puede dar el caso en que resulte difícil revelar el producto de la enzima, esto es que en el zimograma no aparecerá banda, ya sea porque la enzima perdió su función enzimática, porque no se pueda revelar en las condiciones de la reacción o porque la enzima no se produzca. Para interpretación de resultados se considera éste caso como producto de un alelo "nulo" (Tibayrenc, 1979).

La estimación de los pesos moleculares y los patrones electroforéticos de algunas enzimas del metabolismo de *T.cruzi*, ayudan a la determinación del número de subunidades que las forman. El peso molecular estimado para la fosfoglucomutasa (PGM) indica que es una enzima monomérica, lo cual coincide con el bandeo que presenta en electroforesis, ya que se le ha encontrado como una o dos bandas, que correspondería al producto de un homocigoto y un heterocigoto respectivamente (figura 2). Otras enzimas como IDH, 6PGDH, G6PGDH, ME-2, MDH-1 y GPI (Anexo I), que según su peso molecular son enzimas diméricas, en electroforesis presentan una banda, que correspondería al producto de un homocigoto, o tres bandas, con la banda intermedia del doble de intensidad que las otras dos, según se esperaría para una enzima dimérica de un diploide heterocigoto (figura 2). Los datos anteriores apoyan fuertemente la hipótesis de diploidía de *T.cruzi* (Miles, 1985; Tibayrenc y Ayala, 1988).

ENZIMAS MONOMÉRICAS

Genotipo	a/a homocigoto	a/b heterocigoto	b/b homocigoto
Zimograma			
Estructura de la molécula			

ENZIMAS DIMERICAS

Genotipo	a/a homocigoto	a/b heterocigoto	b/b Homocigoto
Zimograma			
Estructura de la molécula			
Zimograma			
Estructura de la molécula			

Figura 2. Ejemplos de patrones isoenzimáticos en organismos diploides. Tomado de Abderrazak et.al., 1993.

Los estudios isoenzimáticos de *T. cruzi* comenzaron en 1974, encontrándose múltiples formas de dos aminotransferasas de aislados *T. cruzi* de regiones geográficas muy diferentes (Miles et al., 1977; Tibayrenc et al., 1986). Miles y colaboradores, en 1977, por medio de análisis isoenzimáticos de varios aislados de *T. cruzi* en Brasil, identificaron por primera vez dos grupos diferentes, provenientes de distintos ciclos de transmisión, uno de un ciclo silvestre (zimodema 1 o Z1) y otro de un ciclo doméstico (zimodema 2 o Z2). Zimodemas son poblaciones que se pueden distinguir entre ellas por medio de sus perfiles isoenzimáticos (Miles, 1983). Éstos resultados apoyaron fuertemente la necesidad de caracterizar bioquímicamente a *T. cruzi*, con el fin de diferenciar cepas del parásito, morfológicamente indistinguibles. Un tercer grupo fue identificado en Brasil que fue denominado zimodema 3 (Z3), el cual pudo ser aislado en ciclos silvestres y domésticos (Miles et al., 1981). Los tres zimodemas (Z1, Z2 y Z3) pueden infectar al hombre, aunque Z3 se ha encontrado rara vez en éste. Sin embargo, no se ha visto una clara relación de la patología de la enfermedad con el zimodema del parásito, y una de las causas es que se pueden encontrar en el mismo paciente mezclas de zimodemas; aunque se sabe que *T. cruzi* Z2 es común en el centro y sureste de Brasil, donde se dan casos de megaesófago y megacolon, mientras en Venezuela, donde Z2 no se ha encontrado, la enfermedad no presenta éstas formas clínicas (Miles, 1985).

Tibayrenc y Desjeux en 1983 caracterizaron isoenzimáticamente dos grupos del parásito en Bolivia, uno más frecuente a grandes altitudes y el otro a bajas altitudes, los cuales no correlacionaban con los zimodemas brasileños y en donde no se vio relación entre éstos y los ciclos de transmisión. Tibayrenc llamo a éstos grupos "cepas isoenzimáticas" (CI), haciendo una distinción de los zimodemas descritos por Miles, los cuales serían las "cepas isoenzimáticas principales", donde las cepas isoenzimáticas serían subgrupos de los zimodemas (Tibayrenc et al., 1984). A éste respecto Miles propuso en 1985 estandarizar criterios usando únicamente el término de zimodema, que sería usado para cada cepa de *T. cruzi* con un perfil isoenzimático único; grupos de zimodemas muy relacionados se denominarían "zimodemas principales".

En un estudio realizado en Paraguay se encontró que el 90 % de los aislados del parásito estaban relacionados con el Z2 boliviano descrito por Tibayrenc (Chapman et al., 1984). En Chile se

podieron agrupar los aislados estudiados en tres principales grupos, uno muy relacionado con el Z1 Brasileño, otro con el Z2 brasileño y el tercero con el Z2 boliviano (Miles et.al.,1984). En Colombia se caracterizaron varios zimodemas que formaron tres grupos: uno selvático relacionado a Z1 brasileño, uno domiciliario relacionado a Z1 brasileño y otro selvático relacionado al Z3 brasileño (Saravia et.al., 1987).

En el análisis de 121 aislados de *T.cruzi* provenientes de muy diferentes regiones geográficas que comprenden desde E.U.A hasta Chile, incluido un aislado mexicano, se pudieron distinguir 43 zimodemas diferentes, entre los cuales se encuentran los tres zimodemas principales que ya habían sido descritos por Miles: Z1, Z2 y Z3 brasileños, que correspondieron a los zimodemas 17, 30 y 27 respectivamente (Tibayrenc et.al., 1986). Se han encontrado diferentes zimodemas dentro de un mismo ciclo de transmisión y hasta dentro del mismo vector u hospedero mamífero (Miles,1985; Tibayrenc et.al.,1986).

Por otro lado es importante mencionar que en parasitología el concepto de "cepa" no es claro. Cepa generalmente se refiere a una población homogénea que posea un grupo de características definidas. Si existen bases genéticas que definan a ésta población, entonces una cepa es una clona natural del parásito (Thompson y Lymbery, 1990). En bacteriología una cepa se define como una población homogénea que provienen de un organismo aislado de un sitio determinado, para *T.cruzi* no vale esta definición de "cepa", ya que organismos genéticamente distintos han sido aislados de una misma región geográfica y un mismo hospedero mamífero o vector. En especies clonales, como parece ser el caso de *T.cruzi*, el término "clonot" se propone para todos los aislados que son idénticos en un grupo determinado de marcadores genéticos (Tibayrenc et.al.,1993).

Tibayrenc y colaboradores propusieron en 1986 una teoría de evolución clonal de *T.cruzi* basados principalmente en que no existen evidencias de que ocurra recombinación ni segregación meiótica en *T.cruzi*, características de la reproducción sexual, y además las distancias genéticas encontradas entre aislados caracterizados por patrones isoenzimáticos son frecuentemente muy largas.

La teoría propone que después de una divergencia antigua, múltiples clones del parásito evolucionaron independientemente, la distribución actual de las clonas se debe a factores dispersores como características geográficas y migraciones de huéspedes mamíferos y vectores (Tibayrenc et.al.,1986; Tibayrenc y Ayala, 1988).

1.5. Análisis de ADN polimórfico.

La identificación y clasificación de organismos como bacterias o parásitos se efectúa tradicionalmente por morfología, requerimientos nutricionales, resistencia a fármacos, análisis isoenzimáticos, y algunas técnicas más recientes como el análisis de secuencias de ARN, y la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (Polymerase Chain Reaction) (Welsh y McClelland, 1990). En estudios epidemiológicos, taxonómicos y de genética de población existe la tendencia a usar metodologías que permitan un análisis directo del genoma, como los basados en PCR o el polimorfismo por fragmentos de restricción, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Estos métodos requieren información previa del ADN en estudio para la elaboración de sondas específicas, lo cual puede resultar sumamente costoso en tiempo y dinero para estudios genéticos de poblaciones (Williams et.al., 1990).

Existen algunos métodos de análisis genómico para la elaboración de mapas genéticos, en los cuales se amplifica al azar ADN polimórfico usando sondas con secuencias arbitrarias de nucleótidos, los cuales se basan en PCR y con los que se obtienen resultados reproducibles. En el método de sondeo arbitrario por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) la sonda se constituye de oligonucleótidos de 10 a 35 pares de bases. Otro de éstos métodos es el de amplificación de marcas del ADN, DAF (DNA Amplification Fingerprinting) que usa sondas pequeñas, de 5 a 8 pares de bases, que permiten visualizar un mayor número de productos de amplificación (Hadrys, Balick y Schierwater, 1992). En 1990 Williams y colaboradores describieron un nuevo método, al que propusieron llamar RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), en el que se especifica un tamaño de la sonda de 10 nucleótidos (Williams et.al., 1990). Se ha demostrado que en RAPD sondas de 10 nucleótidos son eficaces, aunque hay que considerar que un contenido de G+C en la sonda similar al contenido de

G+C en el genoma hara mayor la frecuencia de unión y por lo tanto se tendrán más productos de amplificación (Hadrys, Balick y Schierwater, 1992).

El RAPD se basa en la amplificación del ADN con sondas de secuencia seleccionada arbitrariamente, las sondas se aparean con sus secuencias complementarias en el ADN desnaturalizado y la *Taq* polimerasa sintetiza la cadena de ADN a partir del extremo 3' de las sondas. Los fragmentos amplificados son separados por tamaño por electroforesis sobre gel de agarosa y el perfil de amplificación se visualiza con bromuro de etidio (Bañuls, 1993; Micheli et al., 1993). La presencia de fragmentos amplificados dependerá de que en el genoma en estudio existan secuencias complementarias a la sonda; el perfil de amplificación dependerá de la sonda usada y también de las condiciones de la reacción. Una sonda corta de 10 nucleótidos como la que se usa en los RAPDs tiene una alta probabilidad de encontrar sitios de combinación en el genoma, con la distancia suficiente para que se produzca la amplificación. Solo material genético de alto peso molecular, como ADN no degradado, se debe usar en estudios de RAPD, ya que fragmentos de ADN generarían mucho más polimorfismo del que de por si se genera con las sondas pequeñas, y por lo tanto se mete ruido en el ensayo, provocando que los resultados no se reproduzcan de la manera deseada (Hadrys, Balick y Schierwater, 1992; Micheli et al., 1994).

Por medio del RAPD no se puede distinguir si un segmento de ADN es amplificado a partir de un locus que es heterocigoto u homocigoto. Sin embargo, en taxonomía si todos los miembros de un determinado género o especie presentan un perfil de RAPD característico que los distinga de otros géneros o especies, pero que dentro del grupo sean todos homogéneos, se tiene entonces un importante marcador genético, que puede ser clonado y secuenciado para ser usado como sonda específica del género o especie (Hadrys, Balick y Schierwater, 1992). Se puede dar el caso de que algunos de los productos de amplificación no sean el resultado del acoplamiento perfecto entre la sonda y el genoma, y se produzca basura en los perfiles obtenidos, por lo que en el análisis de un grupo de organismos por medio del RAPD se requieren un grupo de sondas, en las que se debe probar primero su eficiencia de amplificación y la reproducibilidad de los patrones. Su perfil de amplificación en organismos "estantares" (organismos ya caracterizados por otros métodos) es útil en estudios de taxonomía (Hadrys, Balick y Schierwater, 1992).

II. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Estudiar la variabilidad genética de aislados mexicanos de *T. cruzi* para poderlos ubicar dentro de una clasificación estandarizada.

Objetivos particulares.

* Determinar la heterogeneidad molecular existente en aislados mexicanos de *T. cruzi* mediante el análisis isoenzimático y el análisis por amplificación de ADN polimórfico (RAPD).

* Determinar si existe relación de los resultados del análisis molecular con información previa de los aislados, como algunas características biológicas (estudios *in vitro* de crecimiento, transformación epimastigote→tripomastigote, virulencia e infectividad) o epidemiológicas (sitio y huésped ó vector de aislamiento).

* Comparar los resultados obtenidos por medio del análisis isoenzimático y el análisis por RAPD para confirmar el valor del RAPD en estudios epidemiológicos y filogenéticos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. Material biológico.

Se trabajó con 19 aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* y 5 sudamericanos, la procedencia de cada uno se indica en la tabla I.

III.1.1. Cultivo de parásitos.

Los parásitos se cultivaron a 28°C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) complementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) inactivado y 25µg/ml de hemina (SIGMA).

Expansión de los cultivos: 45ml de medio LIT completo más 5ml de un cultivo de parásitos se incubaron a 28°C por 8 días; al octavo día los 50 ml de cultivo se agregaron a un botellón con 350ml de medio LIT completo y se incubaron a 28°C otros ocho días con agitación. Finalmente los parásitos se centrifugaron a 1000g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de parásitos se lavó 2 veces con PBS frío estéril. Se realizó una última centrifugación a 11000g por 10 min. a 4°C.

III.2. Análisis isoenzimático.

Los procedimientos usados en el análisis realizado son adaptaciones de técnicas que se encuentran resumidas en Abderrazak et.al., 1993.

III.2.1. Preparación de extractos isoenzimáticos.

Los parásitos sedimentados se lisaron con una solución hipotónica estabilizadora de enzimas: ditiotreitól 2 mM; ácido aminocapróico 2mM y EDTA 2mM (reactivos SIGMA), agregando un volumen de la solución correspondiente por cada miligramo del sedimento (peso húmedo), p.ej. a un sedimento de 0.4 mg se adicionan 400µl de solución. Se mezcló vigorosamente y se dejó reposar en hielo durante 20 min, después fue centrifugado el lisado a 12000g a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se conservó a -70°C. El sedimento se utilizó para la extracción del ADN total.

III.2.2. Sistemas enzimáticos estudiados.

Se utilizaron 19 sistemas enzimáticos (Anexo I) que nos permiten el estudio de 22 loci : ACON, ALAT, DIA, GAPD, GDH, GOT, G6PD, GPI, IDH, LAP, MDH, ME, MPI, NHi, PEP 1, PEP1+2, 6PGD, PGM y SOD. Se considera que las enzimas DIA, ME y GDH permiten la visualización de dos loci cada una, lo cual se determinó porque en las placas de electroforesis éstas enzimas presentan dos zonas de bandeo con una distancia entre ellas bastante mayor a las que presentan producto de

Tabla 3. Origen geográfico y huésped mamífero o vector de los 24 aislados de *T. cruzi* usados en este estudio.

CEPA	ORIGEN GEOGRÁFICO	HUÉSPED
C4	Jalisco, México	<i>Triatoma barberi</i>
CID	Oaxaca, México	Humano
EA	Morelos, México	Humano
FRV	Oaxaca, México	Humano
H1	Yucatán, México	Humano
H3	Yucatán, México	Humano
H4	Yucatán, México	Humano
H5	Yucatán, México	Humano
H9	Yucatán, México	Humano
H10	Yucatán, México	Humano
HG	Yucatán, México	Humano
NINOA	Oaxaca, México	Humano
QUERÉTARO	Querétaro, México	<i>Triatoma barberi</i>
T	Yucatán, México	<i>Triatoma sp.</i>
TEHUANTEPEC clona 2 (R)	México *	Triatominae
Z10	Yucatán, México	<i>Didelphis marsupialis</i>
Z17	Yucatán, México	<i>D. marsupialis</i>
Z21	Yucatán, México	<i>D. marsupialis</i>
ZACATECAS	Zacatecas, México	Humano
ESMERALDO clona 3	Bahía, Brasil	Humano
PERU	Perú*	Humano
SANTA CRUZ 42 clona 2 (R)	Santa Cruz, Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
SILVIO X10 clona 1	Brasil*	Humano
Y	Sao Pablo, Brasil	Humano

(R) Son las clonas de referencia: Santa Cruz 42 clona 2 (SC43cl2) es zimodema 39 y Tehuantepec (Tchcl2) es zimodema 12, según Tibayrenc y Ayala, 1988.

* Se desconoce la localidad en que fueron aislados.

alelos de un mismo locus. Se anotó DIA-1 para el locus del sistema más rápido de DIA, y DIA-2 para el sistema de DIA más lento, y de igual manera GDH-1, GDH-2, ME-1 y ME-2.

III.2.3. Electroforesis en acetato de celulosa.

Se usó como soporte de la electroforesis placas de acetato de celulosa (HELENA Laboratories, Beaumont, Texas, USA) que se sumergieron 20 min en un amortiguador de impregnación antes de depositar sobre ellas aproximadamente 1µl de muestra con un aplicador especial (HELENA Laboratories). Se colocaron entonces las placas en una cámara de electroforesis (HELENA Laboratories) con dos compartimentos que contenían cada uno 50 ml del amortiguador de migración. El contacto de la placa con el amortiguador se aseguró con bandas de papel filtro. Las condiciones de la electroforesis, como amortiguador de impregnación, amortiguador de migración, voltaje y tiempo, dependen del sistema enzimático en estudio (Anexo III).

III.2.4. Revelación de las placas.

Después de la migración las bandas proteicas se revelaron sobre un medio sólido constituido por 1:1 v/v de agarosa (SIGMA) al 1.2% y la solución de coloración específica de la enzima a revelar (ver Anexo II), sobre la que se colocó la placa. Se introdujo a una estufa a 37°C hasta la revelación de las bandas, entonces se paró la reacción de revelación sumergiendo las placas en ácido acético al 5% por 30 seg., se lavaron las placas con agua y se dejaron secar sobre papel absorbente.

III.2.5. Interpretación de resultados.

Los zimogramas son leídos locus por locus. En cada placa se encuentran 12 muestras de las cuales 2 son cepas de referencia. Las bandas son numeradas según su nivel de migración en la placa: la banda más alejada del origen (la más rápida) será la banda 1, la que le siga será la banda 2 y así continuamos numerando hasta la banda más cercana al origen. En el caso de enzimas que revelan dos loci, la lectura se hace de manera independiente para cada locus, el sistema más alejado al origen será el número 1 y el otro es el 2. En el caso de tener tres bandas equidistantes se considera producto de un heterocigoto para esa enzima y se leen solo las bandas de los extremos (figura 1).

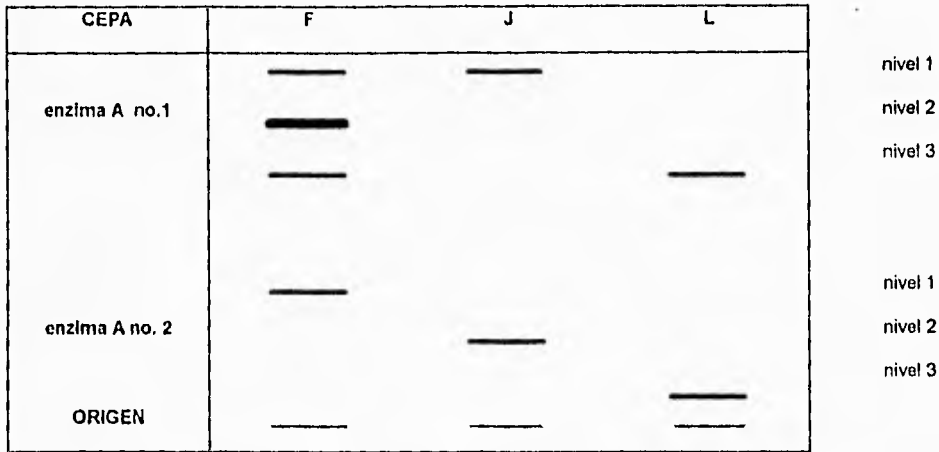


Figura 2. Lectura de la placa de electroforesis para una enzima A con tres aislados de *T.cruzi* F, J y L.. En la electroforesis se revelan dos locis: A-1 y A-2. Las lecturas para cada locus de las bandas producidas por F, J y L son:

A-1:		A-2:	
F heterocigoto	1-3	F homocigoto	1
J homocigoto	1	J homocigoto	2
L homocigoto	3	L homocigoto	3

III.3. Análisis de ADN polimórfico (RAPD).

Las técnicas usadas en este análisis son las reportadas por Bafuls, 1993, y Tarrieu, 1994.

III.3.1. Extracción del ADN.

El ADN es extraído a partir de los sedimentos obtenidos después de la extracción enzimática. La extracción del ADN se realiza en tres etapas:

III.3.1.a. Lisis de las células y digestión.

A un sedimento parasitario de 50-100 mg se agregaron 400µl del amortiguador de lisis TE: TRIS-HCl pH8 10mM y EDTA disódico 1mM; dodecil sulfato de sodio, SDS (SIGMA), al 1% del volumen final y proteinasa K (SIGMA) a una concentración final de 100 µg/ml. La mezcla se incubó durante una noche a 55°C.

III.3.1.b. Desproteinización.

Las proteínas se eliminaron por extracciones sucesivas. Se agregó primero una solución de fenol (Anexo II) volumen a volumen a la suspensión digerida y se mezcló suavemente aproximadamente 5 min.

luego se centrifugó 10 min, 12000 g a 4°C. Se recuperó la fase superior y se realizó una segunda extracción con fenol. De igual forma se realizaron otras dos extracciones con una solución de cloroformo (Anexo II), recuperando la fase superior (acuosa) que es la que contiene al ADN.

III.3.1.c. Precipitación del ADN.

El ADN recuperado en la fase acuosa se precipitó con acetato de sodio al 10% del volumen final y 2.5 volúmenes de etanol frío, durante una hora a -70°C. Después se centrifugó la solución a 12000g durante 15 min a 4°C. Se obtuvo el ADN precipitado y se lavó tres veces con etanol al 70% frío, para eliminar sales y SDS. El ADN lavado se secó y resuspendió en un mínimo volumen de agua estéril.

Una vez obtenido, la medición de la absorbancia del ADN permite calcular su concentración y verificar su pureza. Se trazó la curva de absorción del ADN de 210 nm de longitud de onda a 300 nm (UV) en un espectrofotómetro (DU-70, BECKMAN). La contaminación por ARN o proteínas provoca una distorsión en la curva. Un ADN puro tiene un punto de absorción máximo de 257 nm. La concentración se calculó a partir de la densidad óptica (DO) del máximo de absorción:

$$1 \text{ unidad } DO_{257nm} = 50 \mu\text{g/ml de ADN de doble cadena.}$$

$$\text{Concentración del ADN } (\mu\text{g/ml}) = \text{factor de dilución} \cdot 50 \cdot DO_{257nm}$$

Se ajustó la concentración del ADN a 10 ng/ml con agua destilada estéril y se conserva a -20°C.

III.3.2. Amplificación.

Se trabajó en condiciones lo más cercanas a la esterilidad que sea posible, ya que una sola molécula de ADN contaminante pudo ser amplificada y afectar nuestros resultados. Para verificar la especificidad de las bandas la amplificación con cada sonda se realizó con un testigo negativo (con todos los reactivos necesarios para la amplificación pero sin ADN).

La amplificación se basa en ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde al calentar a 94°C por un minuto, seguido de una disminución de la temperatura a 36°C que permite el alineamiento de las sondas en las secuencias complementarias que encuentran en el ADN y un posterior calentamiento a 72°C donde comienza la síntesis de nuevas cadenas de ADN con los deoxirribonucleótidos (dNTP) que se encuentran en el medio de reacción, por la *Taq* polimerasa, a partir del extremo 3'-OH de cada sonda.

La reacción se realizó en 100µl de medio:

- 1.- 10µl de amortiguador específico de *Taq* polimerasa pH 8.3: Tris-HCL 100 mM pH 8.3; MgCl₂(6H₂O) 15 mM; KCl 500 mM y gelatina 1 mg/ml (todos los reactivos SIGMA),
- 2.- 2µl de cada dNTP 5mM (BIOPROBE Systems) : dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
- 3.- 2µl de la sonda 0.2µM (BIOPROBE Systems): A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A15, A17, A19 y A20 (Anexo IV).
- 4.- 2µl del ADN a amplificar 10 ng/ml,
- 5.- 0.3µl de *Taq* polimerasa (BOEHRINGER MANNHEIN),
- 6.- agua cbp 100µl.

Las muestras preparadas se colocan en el termociclador con el siguiente programa.-

45 ciclos de 3 segmentos:

- desnaturalización del ADN, 1 min a 94°C,
- apareamiento de la sonda, 1 min a 36°C,
- síntesis de la nueva cadena de ADN, 2min a 72°C,

1 ciclo de elongación final de 7 min a 72°C.

El tiempo total de amplificación es de seis horas.

III.3.3. Electroforesis sobre gel de agarosa.

Los fragmentos amplificados de ADN se separaron según sus pesos moleculares por electroforesis sobre un gel de 350 ml de agarosa al 1.6%; usando como amortiguador de corrida TAE (Tris acetato 0.04M y EDTA 0.001M) con bromuro de etidio 1/20 000. Se corrió el gel a 120 voltios durante 3 horas. Enseguida el gel se observó sobre luz UV y se fotografió.

III.3.4. Lectura de los geles.

Se leen los perfiles de RAPDs sonda por sonda. Las bandas de los geles son numeradas de igual manera que en el caso de las isoenzimas; la banda más alejada al origen es la número 1, la que le siga la número 2, y así hasta llegar a la banda más cercana al origen. Se toma en cuenta la intensidad de cada banda anotándola después del número de la banda, uniéndolo por el símbolo (*). Las intensidades relativas se numeran de 1 a 3, siendo 1 para las bandas menos intensas y 3 para las bandas más intensas. En la numeración de las bandas para cada sonda se toman en cuenta cada una de las muestras, incluyendo las cepas de referencia. Todos los aislados que presenten perfiles similares para las

sondas estudiadas se consideran de un mismo "RAPDema" (en analogía con el término zimodema, Bañuls, 1993).

III.4. Métodos de análisis de resultados.

Para conocer la relación entre los zimodemas presentados por los diferentes aislados, se determinó la distancia genética de Jaccard (Jaccard, 1908). Dicha distancia se calcula comparando por pares las bandas en común sobre el número de bandas totales, analizando por pares los 24 aislados, incluyendo las cepas de referencia; según la siguiente fórmula:

$$D_j = 1 - (C / 2N - C)$$

donde D_j es la Distancia de Jaccard, C el número de bandas comunes entre los 2 aislados comparados y N es el número total de bandas revelados por los dos zimodemas o RAPDemas. Estas distancias fueron calculadas por medio de el programa Informático TAXONOMIE (del centro CNRS, Montpellier, Francia).

Para los RAPDemas se calcula otra distancia genética en la que se toman en cuenta las bandas y su intensidad, según la siguiente formula:

$$D = 1 - SAB$$

$$SAB = \frac{\sum_{i=1}^k (a_i + b_i - |a_i - b_i|)}{\left[\sum_{i=1}^k (a_i + b_i) \right]}$$

donde D es la distancia genética, A y B son los perfiles de productos amplificados en los RAPDs de los dos aislados en comparación, a_i y b_i son las intensidades de las bandas, y k es el número de bandas. El cálculo de estas distancias genéticas se realizó también con el programa TAXONOMIE.

Finalmente se construyeron dendogramas que permiten la visualización de las relaciones taxomómicas entre los diferentes zimodemas o RAPDemas, poniendo en evidencia las semejanzas o diferencias entre ellos. Son construidos a partir de las matrices generadas por distancias de Jaccard o por las distancias genéticas obtenidas para los RAPDs, por una clasificación jerárquica ascendente, con ayuda del programa TAXONOMIE.

IV. RESULTADOS

IV.1. Análisis isoenzimático.

Para la preparación de extractos isoenzimáticos se partió de sedimentos parasitarios cuyos pesos húmedos y volúmen de estabilizador de enzimas usado para cada uno se indica en la tabla 4. De ésta manera la cantidad de proteína que se obtuvo en cada sedimento fue similar,

Tabla 4. Pesos húmedos de sedimentos parasitarios y volúmen estabilizador de enzimas usado.

CEPA	Peso Húmedo (g)	Estabilizador de enzimas (μ l)
C4	0.473	473
CID	0.469	469
EA	0.488	488
FRV	0.394	394
H1	0.441	441
H10	0.459	459
H3	0.405	405
H4	0.359	359
H5	0.302	302
H9	0.359	359
HG	0.480	480
Ninoa	0.355	355
Querétaro	0.372	372
T	0.493	493
Z10	0.473	473
Z17	0.515	515
Z21	0.369	369
Zacatecas	0.358	358
Esmeraldo cl3	0.340	340
Peru	0.530	530
Silvio X10	0.319	319
Y	0.300	300

sin embargo la intensidad de las bandas no siempre fue la misma para los diferentes extractos, ya que algunas bandas se revelaron muy débilmente y pasaron inadvertidas; por lo que, cuando no se observó revelación de bandas, se ajustó el volumen de muestra depositado sobre la placa. Aún con éstos ajustes algunas muestras no dieron bandeo para algunos sistemas enzimáticos, en estos casos se anotó 0 en la lectura (se considera que es producto de un alelo nulo).

En general los zimogramas obtenidos de los diferentes aislados mexicanos fueron homogéneos. Son pocas las diferencias que se encontraron en los patrones de bandeo de los aislados mexicanos entre ellos, para los diferentes sistemas enzimáticos; con excepción del aislado C4. Entre algunos aislados la variación se observó en solo un sistema enzimático, como Z17 y Z21, los cuales presentaron diferencias entre ellos sólo en el sistema PGM, ó los aislados H1 y H4 que fueron diferentes en el sistema SOD (tabla 5). También se observó que los perfiles isoenzimáticos presentados por los aislados mexicanos son muy parecidos a la cepa mexicana de referencia Tch cl2 (zimodema 12 según Tibayrenc, Z1 según Miles), presentándose diferencias de bandeo sólo en los sistemas ME-2, ALAT y 6PGDH. La excepción a este patrón fue el aislado C4.

Los sistemas enzimáticos donde se observó mayor variabilidad en las cepas mexicanas son MPI, SOD, PGM, ME-2 y ALAT. Sin embargo algunos de los sistemas enzimáticos usados no fueron de utilidad en la detección de variabilidad como fue el caso de DIA-2, LAP, ME-1, ACON y MDH (tabla 2). Según se esperaba por resultados obtenidos anteriormente por Tibayrenc y col. (1986) las enzimas DIA, GDH y ME permitieron la visualización de dos loci. En la figura 3 se muestra la migración de la enzima ME, donde se observaron dos zonas de bandeo separadas entre sí, correspondiente cada una al producto de un locus diferente.

Un resultado interesante fue el bandeo que presentó el aislado C4 para la enzima GPI, ya que las tres bandas equidistantes de intensidades correspondientes 1:2:1 son características de un heterocigoto, que no se había observado antes en aislados de Centro y Norteamérica. Éste patrón heterocigoto de C4 para GPI es similar al que presenta Tulahuen cl2 (TULA, cepa chilena de referencia, zimodema 43 según Tibayrenc) y distinto al de SC43cl1 (zimodema 39 según Tibayrenc) (figura 4).

Apartir de los zimodemas se calcularon las distancias de Jaccard, que son índices de similitud de las cepas entre sí, comparando por pares los patrones enzimáticos obtenidos. Estas distancias sirvieron para construir un dendograma donde se ordenaron jerárquicamente las cepas analizadas según su grado de similitud entre ellas. Por lo que entre menos distancia exista en las ramificaciones que conectan a los aislados entre sí, éstos estarán más relacionados filogenéticamente.

Los aislados H9, H5, H3 y Z17 por un lado, y HG,T y Z10 por otro lado (todos yucatecos), presentaron patrones isoenzimáticos idénticos, por lo que aparecen como zimodemas repetidos en el dendograma (figura 5); ambos grupos solo difieren entre sí en el patrón de bandeo de SOD.

Como ya se mencionó el aislado C4 rompió la homogeneidad en el conjunto de aislados mexicanos, ya que los patrones isoenzimáticos que presentó difieren notablemente con los presentados por los demás aislados mexicanos, incluyendo el aislado de referencia Tch cl2. Por esto se hizo un análisis especial de C4, y se comparó con la cepa Tulahuen cl2, cepa con la que sospechaba estaba más relacionada debido al bandeo presentado en GPI. Este análisis comprendió las enzimas MPI, PGM, ME, GPI y GDH. Tulahuen y C4 tuvieron bandeos similares en los sistemas MPI, PGM, ME y GPI, pero fueron diferentes para GDH (fig. 6).

Las cepas de referencia sudamericanas con que contamos en el laboratorio, Silvio X10 cl1 y Esmeraldo cl3, que fueron analizadas al mismo tiempo que los aislados mexicanos y las cepas de referencia mantenidas en Francia, aparecen con patrones isoenzimáticos similares a las que se han reportado para éstas en el laboratorio del Dr. Tibayrenc, zimodemas 17 y 30 respectivamente (Z1 y Z2 según Miles) (Tibayrenc y Ayala, 1988).

En el dendograma construido (figura 5) se observan tres ramificaciones principales: la primera agrupa a las cepas mexicanas y a las sudamericanas Y y Perú; la segunda ramificación une a la cepa brasileña Silvio X10 y la tercera incluye a la cepa mexicana C4, la boliviana SC43 cl1 y la brasileña Esmeraldo cl3.

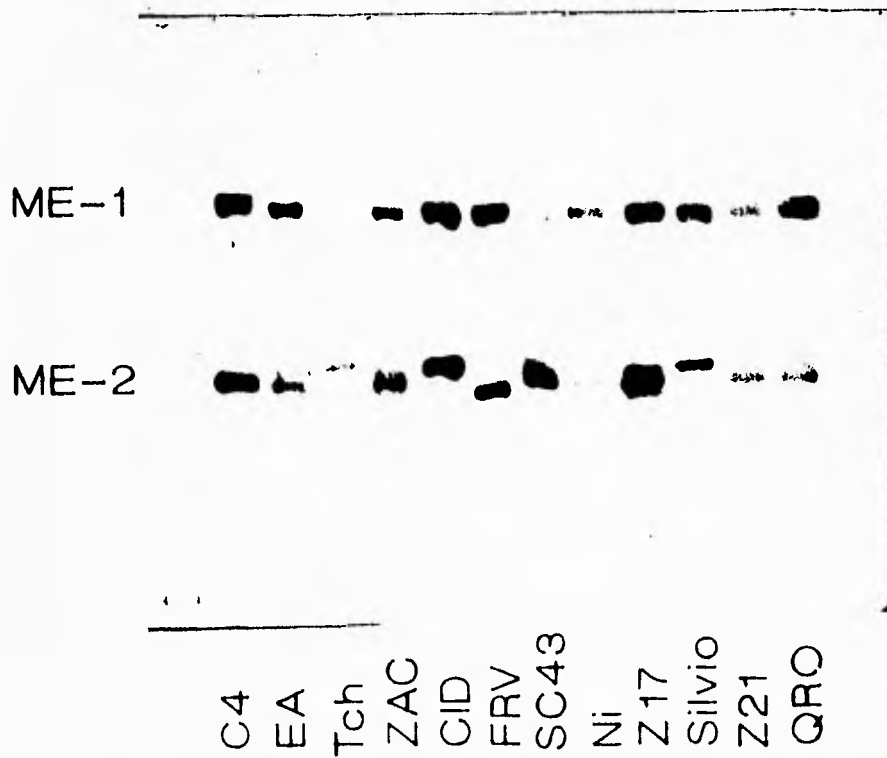


Figura 3. Electroforesis sobre acetato de celulosa del sistema ME. Se pueden observar las dos regiones de migración: ME-1 y ME-2, correspondiente cada una al producto de un locus diferente.



Figura 4. Electroforesis sobre acetato de celulosa del sistema GPI. Las cepas sudamericanas SC43c11 y Tulahuen cl2 (TULA) y la mexicana C4 presentan un triple bandeo correspondiente al producto de un heterocigoto para ésta enzima.

Tabla 5. Zimodemas caracterizados por el estudio de 22 loci de aislados mexicanos de *T.cruzi*

AISLADOS	MPI	SOD	PGM	GOT	SPODH	DIA-1	DIA-2	LAP	IGAPD	IGSPDH	IDH	ME-1	ME-2	ALAT	ACON	MDH	GDH-1	GDH-2	GPI	NHI	PEP 1	PEP 1+2
C4	2	1-2-3-4	2-4	1-2	0	3	1	1	1	1	2	1	2	3	1	1	1	2	1-3	1	2	3
CID	1-2	1-2-3-5	1-2	3	0	2	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	3	0	4	2	1	1
EA	1	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	1	1	1	3	2	4	2	1	1
FRV	2	1-2-3-5	1-2	3	2	2	1	1	1	2	1	1	3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H1	1	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H3	2	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H4	1	1-2-3-4-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H5	2	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H9	2	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
H10	2	1-2-3-4-5	1-2	3	0	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
HG	2	1-2-3-4-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Nihoa	1-2	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Querétaro	1-2	1-2-3-5	1-2	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
T	2	1-2-3-4-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Tchcl2	2	1-2-3-5	1	3	0	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1	4	2	1	1
Z10	2	1-2-3-4-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Z17	2	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Z21	2	1-2-3-5	1-2	3	2	2	1	1	1	2	1	1	1-3	2	1	1	3	1	4	2	1	1
Zacatecas	1	1-2-3-5	1	3	2	2	1	1	3	2	1	1	1-3	2	1	1	3	2	4	2	1	1
Esmeraldo cl3	2	1-2-3-4	3-4	2	1	1-2	2	2	2	1	2	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	2
Peru	2	1-2-3-5	1	3	0	2	1	1	3	2	1	1	1	3	1	1	3	2	4	2	1	1
SC43cl1	2	1-2-3-4	2-4	2	1-2	3	1	2	2	2	2	1	2	4	1	1	1	1	1-3	1	3	4
Silvio X10	1	1-2-3-4-5	1-2	3	0	2	1	1	1	3	1	1	1	4	2	1	3	1	4	2	3	3
Y	2	1-2-3-5	1	3	0	2	1	1	3	2	1	1	1	2	1	1	3	2	4	2	1	1

FALLA DE ORIGEN

Cada número representa el nivel de migración de la enzima en la placa de electroforesis.

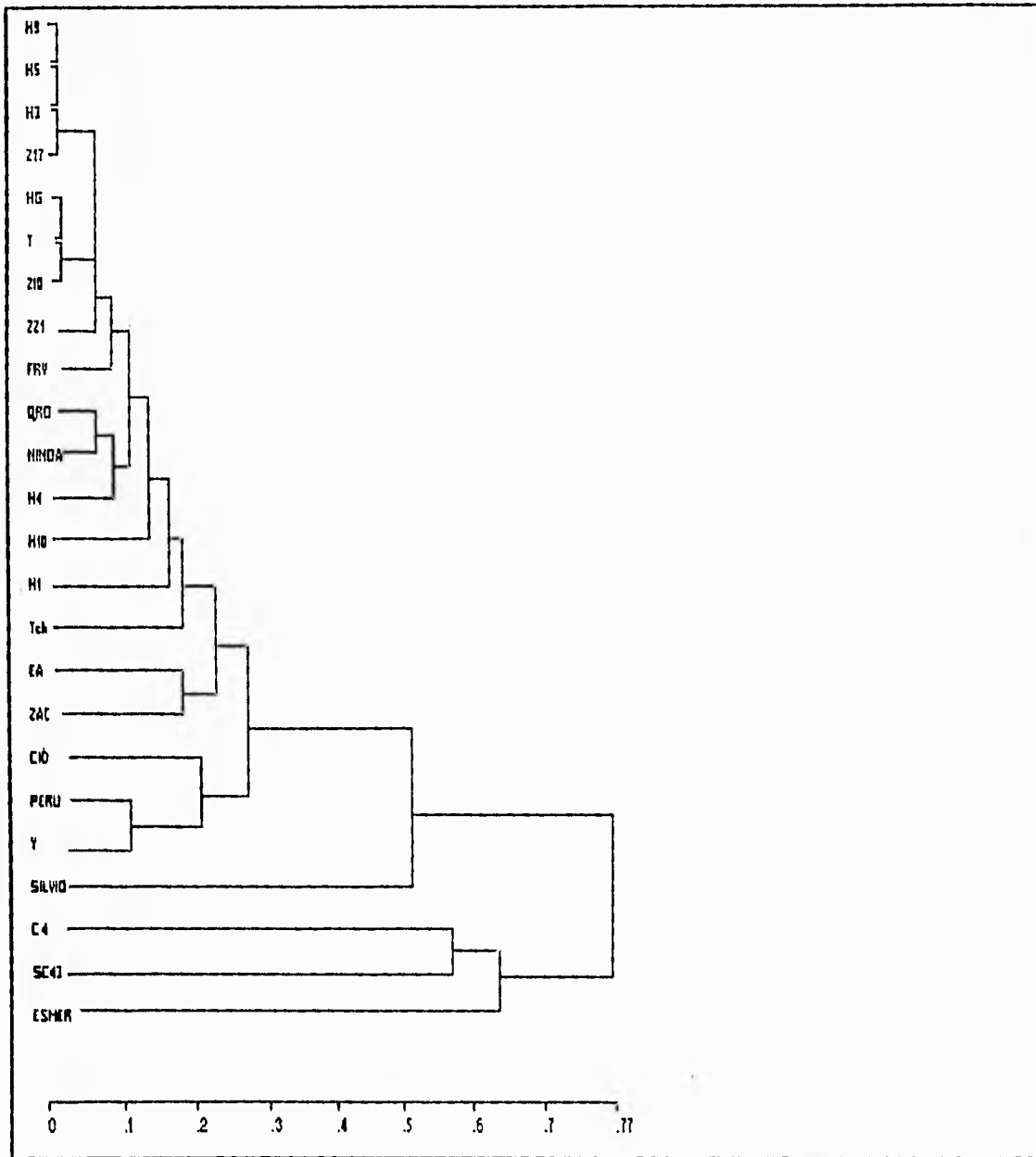


Figura 5. Dendrograma construido a partir de la matriz de las distancias de Jaccard estimadas comparando por pares los patrones isoenzimáticos de los aislados de *T. cruzi*.

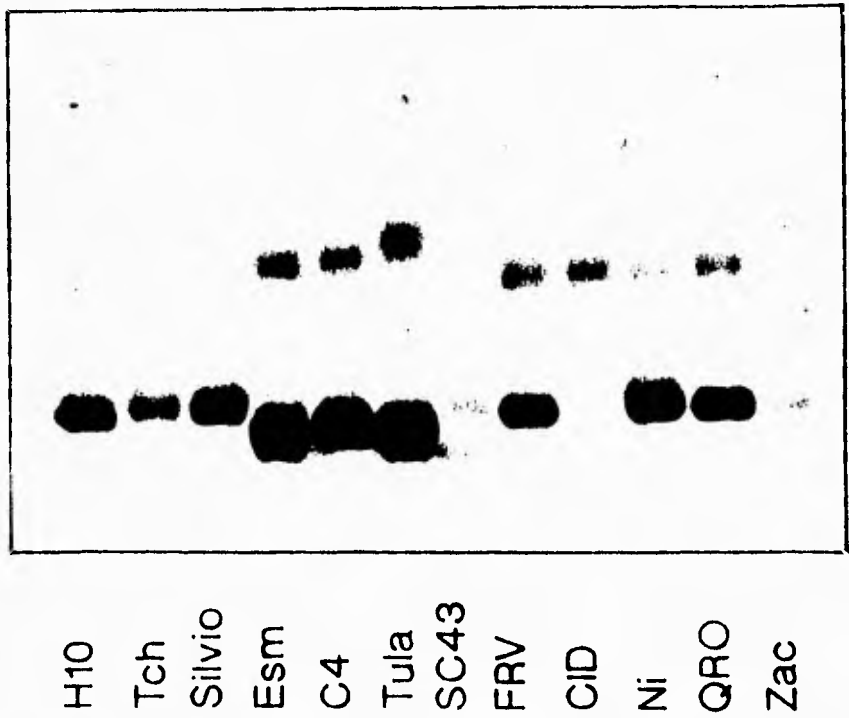


Figura 6. Electroforesis sobre acetato de celulosa para el sistema GDH. Para ver la relación entre el aislado C4 y la cepa sudamericana Tulahuen (TULA) se analizaron 6 sistemas enzimáticos, de los cuales solo con el sistema GDH se vieron diferentes C4 y TULA.

VI.2. Análisis por RAPD.

Para el análisis de cepas mexicanas de *T. cruzi* por la técnica de RAPD se estandarizó la concentración del ADN de cada muestra a 10 µg/ml, por lo que se calculó la concentración de las muestras a partir de la D.O. a 257nm (tabla 6).

Tabla 6. Concentración final de ADN.

CEPA	D.O a 257nm	Concentración de ADN (µg/ml)
C4	0.536	1.87
CID	0.674	2.36
EA	0.230	0.86
FRV	0.544	1.90
H1	0.633	2.20
H10	0.643	2.25
H3	0.430	1.50
H4	0.490	1.70
H6	1.028	3.60
H9	0.684	2.24
HG	0.428	1.50
Ninoa	0.385	1.35
Querétaro	0.678	2.37
T	0.497	1.74
Z10	0.347	1.20
Z17	0.643	2.25
Z21	0.440	1.50
Zacatecas	0.888	3.00
Esmeraldo cl3	0.391	1.37
Peru	0.480	1.70
Silvio X10 cl1	0.615	2.00
Y	0.646	2.26

Concentración de ADN (µg/ml) = D.O a 257nm * 50 * Factor de Dilución (en éste caso es 70, ya que todas la muestras al ser leídas se diluyeron 1/70 en agua destilada

Para verificar la pureza del ADN extraído se realizaron curvas en el espectrofotómetro de 220 a 300 nm, los resultados indicaron que no existe material contaminante. La figura 7 muestra un análisis representativo con el ADN del aislado H5.

Una vez verificada la pureza y ajustada la concentración de todas las muestras de ADN se llevo a cabo la amplificación de éstas con 14 sondas seleccionadas previamente por producir patrones reproducibles con *T.cruzi* (Tibayrenc et.al., 1993). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis sobre gel de agarosa al 1.6% teñido con bromuro de etidio.

Para todas las sondas analizadas se realizaron testigos en los que se se agregaban todos los componentes de la reacción excepto el ADN, para detectar cualquier contaminación. En algunos casos aparecieron una o dos bandas en los testigos, pero éstas no eran tomadas en cuenta en la lectura de los geles. La cantidad de productos de cada sonda fue variable. Las sondas A1, A3, A4, A5, A17 y A19 fueron las que presentaron más bandas y también más variabilidad entre las diferentes cepas (figura 8). Se había observado ya con otros aislados de *T.cruzi* (Tibayrenc et.al.,1993) que las sondas A8 y A20 eran monomórficas (presentan una sola banda). En nuestro caso A8 fue monomórfica, pero con A20 se obtuvieron dos bandas.

En éste estudio los RAPDemas obtenidos muestran mayor polimorfismo que los zimodemas, debido a que el análisis directo del ADN nos permite un sondeo más amplio del genoma, y además la lectura de los geles es más compleja ya que no sólo fue tomada en cuenta la cantidad de bandas en el gel, sino también su intensidad. No encontramos RAPDemas repetidos. La cepa mexicana C4, al igual que en análisis de isoenzimas, es la que presenta más variaciones en sus perfiles de amplificación con respecto a las demás cepas mexicanas, las cuales no presentaron mucha variabilidad entre ellas y con respecto a la cepa de referencia Tch cl2 (tabla 7).

Se obtuvo un dendograma a partir de los RAPDemas (figura 8) en donde se encuentran los aislados mexicanos vinculados entre sí, y con la cepa de referencia Tehuantepec. H9, H5, Z17, HG, T y H10 forman un grupo en éste dendograma; éstos mismos se encontraron como dos zimodemas repetidos relacionados entre sí. La ramificaciones generales se conservan igual que en

el dendograma obtenido de los zimodemas: Silvio X10 sale del grupo de las cepas mexicanas y más alejados aparecen Esmeraldo cl3, SC43 cl1 y C4.

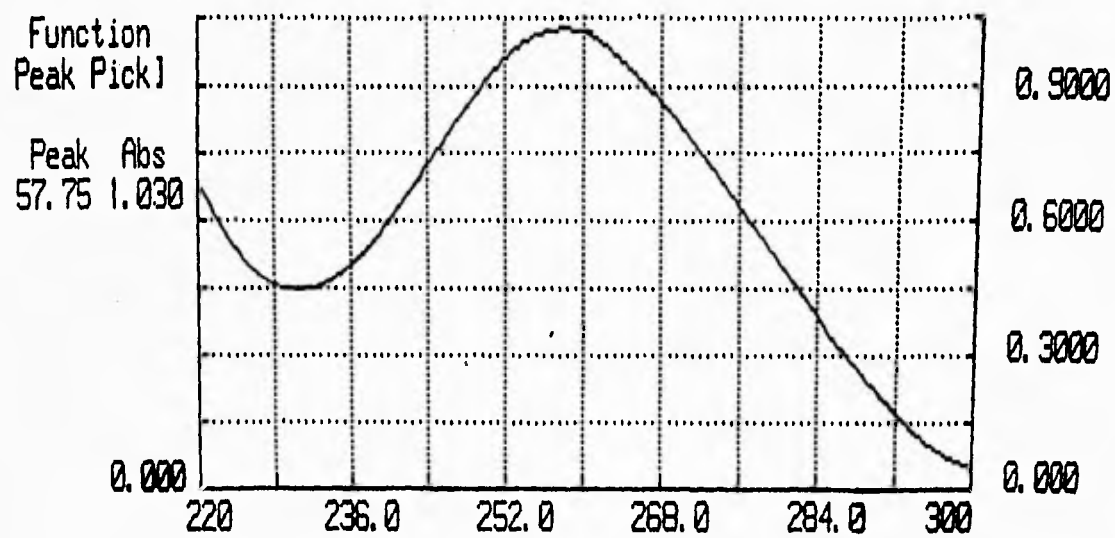


Figura 7. Curva de absorción de 220 nm a 300nm del ADN de la cepa H5. El máximo de absorción se tiene a 257 nm-

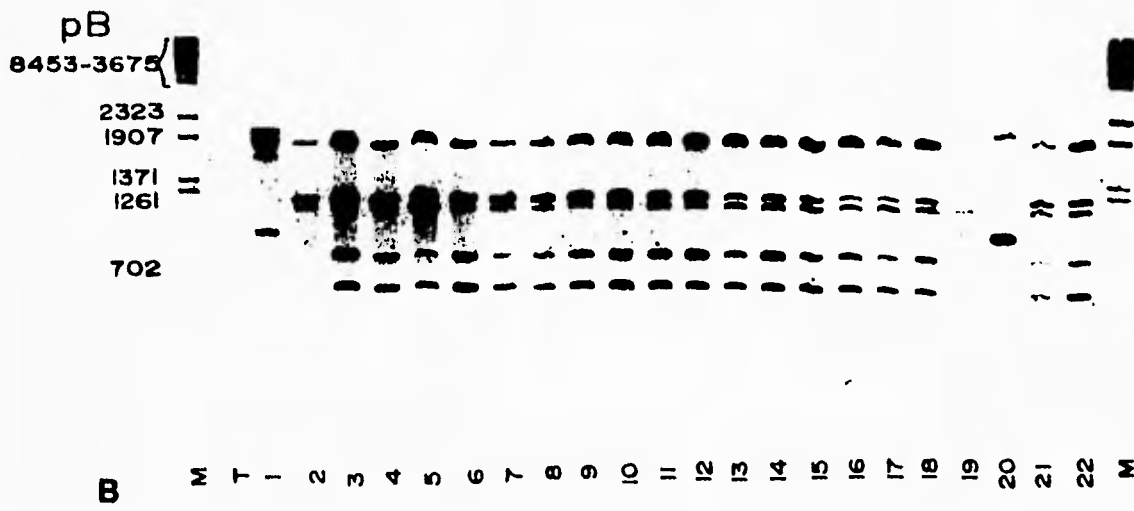
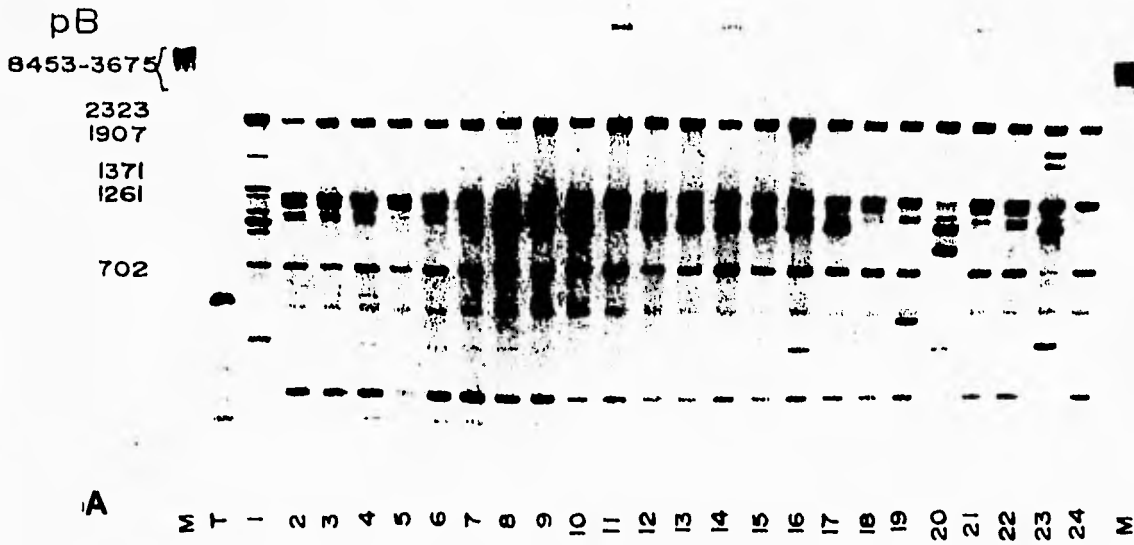


Figura 8. Perfiles de amplificación sobre gel de agarosa al 1.6% teñido con bromuro de etidio. En (A) se muestra los patrones obtenidos con la sonda A4 y en (B) los obtenidos con la sonda A19. M=marcadores de peso molecular, T=testigo (contiene todos los productos para la amplificación sin muestra de ADN, para detectar posibles contaminaciones), 1=C4, 2=EA, 3=Zacatecas, 4=CID, 5=FRV, 6=NInoa, 7=H1, 8=H3, 9=H4, 10=H5, 11=H9, 12=H10, 13=HG, 14=T, 15=Z10, 16=Z17, 17=Z21, 18=Y, 19=Silvio, 20=Esmeraldo, 21=Perú, 22=Querétaro, 23=SC43 cl1 y 24=Tch cl 2.

Tabla 7. RAPDemas caracterizados por el estudio de 14 sondas para las cepas mexicanas de *T.cruzi*

AI SLADOS	A1	A2	A3	A4	A5
CA	3*2-12*3	3*3	3*2-4*3-5*1-6*1-7*3	2*3-3*1-4*1-5*2-6*1-9*2-10*1-12*2	5*2-6*1-7*1-9*1
CID	1*1-4*1-7*1-8*1-10*2-12*2-14*1	1*2-3*3-6*1-9*1	1*1-2*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-8*2	1*1-2*3-6*3-7*2-12*3-13*2	2*1-5*1-6*1-11*2-12*3
EA	1*2-2*1-4*2-5*1-8*2-9*1-12*2-14*1	1*2-3*3-6*1-9*1	1*2-3*1-4*3-5*1-6*1-7*2-8*2	2*2-6*3-7*2-12*2-13*1	5*1-6*2-11*2-12*2
FRV	1*2-2*1-4*1-9*2-10*3-12*2-14*1	1*2-3*3-6*1-9*1	1*2-2*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-8*2	2*3-6*2-7*2-12*1-13*1	1*1-8*2
H1	1*1-4*1-5*1-8*1-10*3-12*2-14*2	1*2-3*3-6*1-9*1	1*2-3*2-4*3-5*2-6*2-7*2-8*2	2*3-6*3-7*3-12*2-13*2	3*1-4*1-5*1-6*2-11*2-12*2
H3	1*1-4*1-5*1-8*1-10*2	1*2-3*3-6*1-9*1	1*1-2*1-4*3-5*2-6*2-7*2-8*2	2*3-6*3-7*2-9*3-12*2-13*1	2*1-3*1-4*1-5*2-6*2-11*3-12*3
H4	1*1-2*1-4*1-5*1-8*2-10*3-12*2-14*2	1*3-3*3-6*1-9*1	1*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-8*1	2*3-6*3-12*1-13*2	3*1-4*2-5*2-6*2-11*3-12*3
H5	1*2-2*1-4*2-5*1-6*1-8*2-9*2-12*1-14	1*2-3*3	1*1-2*1-3*1-4*3-5*1-6*1-7*1-8*2	2*2-6*3-7*2-9*3-12*2-13*1	2*1-3*1-4*1-5*2-6*2-11*3-12*3
H9	1*2-2*1-4*1-5*1-8*2-9*2-12*2-14*2	1*1-3*3	2*1-4*3-5*2-6*1-7*2-8*2	1*2-2*3-6*3-7*1-12*2-13*2	2*1-3*1-4*1-5*2-6*2-11*3-12*3
H10	1*1-2*2-4*2-8*1-9*1-12*2-14*2	1*3-3*3-6*1-9*1	1*1-2*2-3*1-4*3-5*2-6*2-7*2-8*2	2*3-6*3-7*2-9*3-12*2-13*1	2*1-5*2-6*2-11*3-12*3
HG	1*3-2*2-4*2-5*2-8*1-9*2-14*2	1*2-3*3-6*1	1*1-2*1-3*1-4*3-5*1-6*1-7*2-8*2	2*3-6*3-7*1-9*3-12*2-13*1	2*1-3*1-5*2-6*3-11*3-12*3
Ninoa	4*1-8*1-9*1-10*3-12*2-14*1	1*1-3*3-6*1-9*1	1*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-8*2	2*3-6*3-7*2-12*2-13*2	11*1-12*1
Peru	1*2-2*1-4*2-7*2-8*1-9*1-12*2-14*2	1*1-3*3	1*1-2*2-5*3-6*1-7*1-8*2-9*2	1*1-2*3-6*3-7*1-8*1-12*2-13*1	2*1-5*1-6*1-11*1-12*3
Querétaro	1*1-4*1-8*1-9*2-12*2-14*1	3*3	1*1-3*2-4*3-5*1-6*1-7*2-8*2	2*3-6*3-7*2-8*1-12*2-13*2	5*1-6*2-11*2-12*3
T	1*2-2*2-4*2-5*2-8*1-9*2-12*2-14*2	1*2-3*3	1*2-2*1-3*2-4*3-5*1-6*1-7*2-8*2	1*1-2*3-6*3-7*3-9*3-12*2-13*2	5*1-6*2-11*2-12*3
Tchcl2	1*2-2*2-4*2-9*2-12*1-13*1	1*3-3*3-6*1-9*1	1*2-2*1-3*2-4*3-5*2-6*2-7*1-8*2	2*3-6*3-12*3	2*3-4*2-5*2-6*2-11*1-12*2
Z10	1*2-2*1-4*1-5*1-8*1-9*2-10*2-12*1-1	1*2-3*3	1*1-3*1-4*3-5*1-6*1-7*1-8*1	2*3-6*2-7*1-9*3-12*1-13*1	3*1-5*2-6*2-11*2-12*2
Z17	1*2-2*1-4*2-5*2-8*2-9*2-12*1-14*2	1*2-3*3-6*1-9*2	1*1-2*1-3*1-4*3-5*2-6*2-7*2-8*2	2*3-6*3-7*1-9*3-12*2-13*2	2*1-3*1-5*2-6*3-7*1-11*3-12*3
Z21	1*1-4*1-9*1-10*3-12*1-14*1	1*2-3*3-6*1-9*1	1*1-2*1-3*1-4*3-5*2-6*2-7*2-8*2	2*3-6*3-7*1-9*3-12*2-13*2	3*1-5*1-6*2-11*2-12*2
Zacatecas	1*2-2*1-4*2-5*1-8*1-10*2-12*1-14*1	1*2-3*3	1*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-9*2	2*3-6*3-7*2-12*2-13*1	4*1-5*2-6*2-11*3-12*3
Esmeraldo	3*2-11*2-13*1	3*3	3*1-4*3-7*1	2*3-6*3-8*2-12*2-13*2	5*1-7*2-9*2-10*1-13*3
SC43cl1	3*2-10*2-12*3	2*2-3*3-4*2-5*1-7*1-8*1-9*2	3*2-4*3-6*1-7*2-8*2	2*3-3*2-4*2-6*3-9*3	5*2-9*2-12*3-13*2
Silvio X10	1*1-4*1-8*1-10*3-11*1-14*1	1*1-3*3-6*1	2*2-3*2-4*3-5*2-6*1-7*2	2*3-6*1-8*1-9*3-11*3	5*1-6*2-12*3
Y	10*1-12*1	3*3	1*1-2*2-3*2-4*3-5*1-6*1-7*1-8*2	1*1-2*2-6*2-7*1-12*2-13*2	2*1-5*1-6*1-11*2-12*3

FALLA DE ORIGEN

El primer número representa el nivel de migración de la banda del producto amplificado y separado por el símbolo * el segundo número se refiere a la intensidad de la banda. 1 corresponde a las bandas menos intensas y 3 a las bandas más intensas

Tabla 7. RAPDemas caracterizados por el estudio de 14 sondas para las cepas mexicanas de *T. cruzi*

CEPAS	A7	A8	A9	A10	A15	A17	A19	A20
C4	2*2-5*2-7*2	1*3	2*1-3*1-4*2-9*3	4*3	2*3	6*1	2*2-3*2-4*1-7*1	1*3-2*1
CID	1*3-4*1-7*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*2	1*1-3*2-5*2	2*1-3*2-4*2-5*1-7*1-8*3	3*2-5*2-6*1-8*1-9*1	1*3-2*1
EA	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	3*2-5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-5*1-7*1-8*3	3*1-5*2-6*1-9*1	1*3-2*1
FRV	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	3*2-5*2	1*3-8*1	3*1-5*1-6*3-8*1-9*1	1*3-2*1
H1	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	3*2-5*2	1*2-2*1-3*2-4*2-5*1-7*1-8*3	3*1-5*2-6*1-8*1-9*1	1*3
H3	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	1*1-3*3-5*2	1*3-2*1-3*1-4*1-8*2-9*1	3*2-5*2-6*1-8*1-9*1	1*3-2*1
H4	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	3*2-5*2	2*1-3*3-4*3-5*1-6*1-8*3	3*3-5*2-6*1-8*1-9*2	1*3-2*1
H5	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	5*3	3*2-5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-5*1-6*1-8*2	3*2-5*2-6*2-8*1-9*2	1*3
H9	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-5*1-8*2	3*2-5*2-6*2-8*1-9*2	1*3-2*2
H10	1*3-5*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-8*2	3*3-5*3-6*2-8*2-9*2	1*3-2*2
HG	1*3-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	3*2-5*2	1*3-2*1-3*2-4*1-8*2	3*3-5*2-6*2-8*1-9*2	1*3-2*2
Ninoo	1*3-4*2-5*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-5*1-7*1-8*3	3*2-5*2-6*1-8*2-9*2	1*3-2*1
Peru	1*3-4*1-8*2	1*3	5*3-7*1	2*1-5*1	1*1-3*2-5*2	1*3-2*1-3*2-4*2-5*1-8*2	3*1-5*2-6*1-8*1-9*1	1*3-2*2
Querétaro	1*3-5*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*2	6*2	1*3-2*1-3*2-4*2-8*2	3*3-5*2-6*2-8*2-9*2	1*3-2*1
T	1*3-4*1-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	3*2-5*2	1*3-2*1-3*2-4*1-5*1-8*2	3*3-5*2-6*2-8*2-9*2	1*3-2*2
Tchcl2	1*3-4*2-8*1	1*3	1*2-3*2-4*1-8*3	4*3	1*1-3*2-5*2	1*3-2*2-3*1-4*1-5*1-7*1-8*2	1*1-3*1-5*2-6*2-9*1	1*3-2*2
Z10	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	5*2	1*3-3*2-4*1-8*2-9*1	3*3-5*2-6*2-8*2-9*2	1*3-2*2
Z17	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	3*2-5*2	1*3-4*1-8*2	3*2-5*2-6*2-8*2-9*2	1*3-2*2
Z21	1*3-8*2	1*3	5*3-7*3	2*2-5*3	3*1-5*2	1*3-2*1-3*3-4*2-5*1-7*1-8*2	3*2-5*2-6*2-8*1-9*2	1*3-2*2
Zacatecas	1*3-4*2-8*2	1*3	5*3-7*3	2*1-5*3	1*1-3*2-5*2	1*3-3*1-4*1-8*1	3*2-5*3-6*1-8*2-9*2	1*3-2*1
Esmeraldo	2*1-5*2-7*2	1*3	2*3-3*1-4*1-6*2	2*3-3*3-5*1	4*3	7*3	2*1-3*1-6*1-7*3-8*1-9*1-10*	1*3
SC43cl1	2*3-5*3-6*2	1*3	3*3-4*2-6*2-7*1-8*3	1*2-6*3	2*3-4*1	1*1-5*3-7*3	3*3-7*3-9*1	1*3
Silvio X10	1*3-3*3-8*2	1*3	5*3-7*2	2*1-5*3	5*2-6*1	5*2	3*1-5*1-6*2-8*1-9*1	1*3-2*3
Y	1*3-4*1-5*1-8*2	1*3	5*3-7*3	2*3-5*3	3*2-5*2	2*1-3*3-4*3-5*1-7*1-8*3	3*3-5*2-6*2-8*2-9*2	1*3-2*2

FALLA DE ORIGEN

El primer número representa el nivel de migración de la banda del producto amplificado y separado por el símbolo * el segundo número se refiere a la intensidad de la banda. 1 corresponde a las bandas menos intensas y 3 a las bandas más intensas

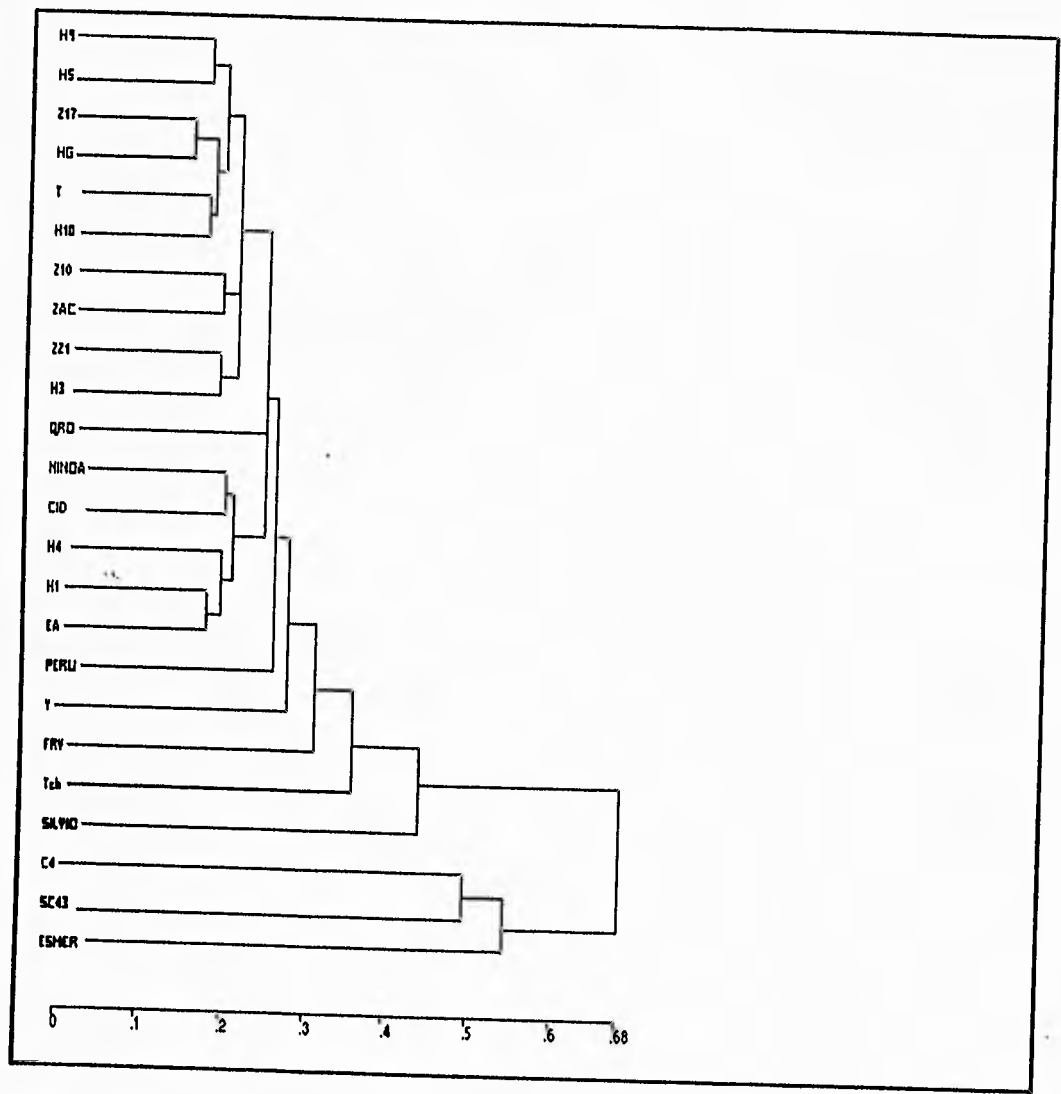


Figura 9. Dendrograma construido a partir del análisis por RAPD.

V. DISCUSIÓN.

El estudio de caracteres isoenzimáticos en *T. cruzi* proporciona la información genética necesaria para caracterizar diferentes aislados de *T. cruzi*, morfológicamente indistinguibles; para definir la heterogeneidad existente en el parásito de acuerdo a sus distintos huéspedes y vectores, sus ciclos de transmisión ó su distribución geográfica; y posiblemente ayude a asociar diferencias genotípicas con las diferentes formas que presenta la enfermedad de Chagas. Además el análisis isoenzimático ha permitido establecer un nuevo parametro de clasificación taxonómico en *T. cruzi* a través de zimodemas y generar algunas teorías sobre el origen evolutivo del parásito.

El estudio isoenzimático de diferentes aislados mexicanos de *T. cruzi* mostró homogeneidad entre éstos, con excepción del aislado C4, lo cual está de acuerdo con la homogeneidad vista anteriormente en estudios realizados por Ortega, caracterizando 10 aislados mexicanos con 6 enzimas (Ortega, 1980), y por Galván y colaboradores caracterizando 5 aislados con 13 enzimas (Galván et.al., 1982).

Las enzimas usadas en nuestro estudio se eligieron porque tienen una buena definición y reproducibilidad en acetato de celulosa, permiten una mejor comparación de patrones heterocigotos, y algunas de ellas se han usado constantemente en la caracterización de zimodemas de *T. cruzi* en algunos países sudamericanos como Bolivia y Brazil (Miles et.al., 1980; Lanham et.al., 1981; Luquetti et.al., 1986; Tibayrenc y Ayala, 1980). Las enzimas PGM y GPI son de las más usadas en éste tipo de estudios ya que producen más información que las otras, lo cual se corroboró en éste trabajo, ya que PGM fue una de las enzimas que reveló más heterogeneidad y GPI permitió distinguir a C4 como un aislado especial en el estudio.

La homogeneidad entre los aislados mexicanos se puede visualizar en las placas de electroforesis y zimogramas obtenidos, y se pone en evidencia en el dendograma construido a partir de las distancias de Jaccard, donde además se puede ver que los aislados analizados están muy relacionados con el zimodema 12, clona de referencia Tehuantepec (Tibayrenc y Ayala, 1988).

En estudios isoenzimáticos anteriores de aislados de *T.cruzi* de Centro y Norteamérica, se ha encontrado homogeneidad entre ellos, todos pertenecientes o muy relacionados al zimodema 12 (Tibayrenc y Le Ray, 1984; Tibayrenc, 1986; Darce y Revollo, comunicación personal).

Los resultados no revelan correlación entre los zimodemas caracterizados de aislados mexicanos y el origen geográfico de los parásitos, huésped mamífero o vector del que fueron aislados, características biológicas "in vitro" como crecimiento, metacicloogénesis y virulencia (López, 1994), ó análisis con enzimas de restricción de regiones no transcritas del ADN ribosomal (Zavala, Velasco y Hernández, 1992).

Dos de los zimodemas encontrados comprenden varios aislados, es decir que hubo aislados que presentaron los mismo patrones electroforéticos. A su vez éstos dos zimodemas presentaron diferencias entre ellos sólo en una enzima. Un zimodema comprende los aislados H9, H3, H5 y Z17, los tres primeros de origen humano y el último de reservorio mamífero; y otro zimodema comprende a los aislados HG, T y Z17, el primero de origen humano, el segundo de vector y el tercero de reservorio mamífero. Es evidente que no se pudo correlacionar el zimodema con su origen de vector o huésped mamífero, lo que también sucedió con los demás aislados.

En cuanto al origen geográfico de los aislados tampoco se vio una clara correlación con los zimodemas obtenidos, aunque los aislados que presentan zimodemas repetidos son todos de Yucatán.

Sabemos que la patología producida por los aislados yucatecos no es severa (Dr. Barrera-Pérez, comunicación personal), pero de los demás se desconocen las características clínicas de la enfermedad que producen. Por lo anterior no es posible hacer comparaciones entre zimodemas y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Actualmente se realizan estudios del comportamiento de algunos de los aislados en ratón, una vez que se tengan los resultados se podrá analizar su relación con los zimodemas que presentan.

Un análisis a nivel de fragmentos de la región espaciadora del ADN ribosomal y enzimas de restricción de ADN total con el mismo conjunto de aislados y clonas de *T.cruzi* que usamos en nuestro estudio, pudo agruparlos de acuerdo con su origen geográfico: un grupo formado por los aislados del estado de Yucatán, otro formado por los aislados de la región central de México y un

tercero que comprende los aislados sudamericanos (Zavala, Velasco y Hernández, 1992). Con estudios de caracterización biológica "in vitro", los mismos aislados se pudieron agrupar de manera similar que en el estudio de Zavala y colaboradores (López, 1994). Nuestro análisis isoenzimático conduce a un agrupamiento entre las cepas, sin embargo éste es diferente al que se encontró anteriormente, ya que se tiene un grupo formado por los aislados mexicanos y los sudamericanos Y y Perú, un segundo grupo está formado por la clona Silvio X10 y un tercero que comprende las clonas Esmeraldo y Santa Cruz 43 y el aislado mexicano C4.

En el estudio realizado, C4 aparece más cercano filogenéticamente a las cepas sudamericanas que a las mexicanas, que es en sí un resultado sorprendente, lo cual podría deberse a la "importación" de éste aislado desde Sudamérica por algún individuo con la enfermedad de Chagas que viajó a Jalisco, o porque algún viajero halla traído en su equipaje al vector infectado. Más interesante sería que la heterogeneidad de C4 pudiera deberse a que en Jalisco las poblaciones del parásito sean distintas a las de otras regiones de la República Mexicana, y que éste sea uno de los motivos por lo que la enfermedad se presente con un cuadro clínico más severo en éste estado.

Además, el aislado de Jalisco C4 presentó patrones enzimáticos realmente diferentes, como el patrón de bandedo heterocigoto con el sistema GPI, que es igual al que presenta la clona Tulahen, el cual no es común de encontrar. Éste patrón heterocigoto para GPI ha sido encontrado casi exclusivamente en ciclos de transmisión domésticos (Tibayrenc y Desjeux, 1983), lo que correlaciona con el hecho de que C4 fué aislado de *T. barberi*, de habitat doméstico, el cual es el vector más importante de la enfermedad en México (WHO, 1991). El dendograma muestra al aislado C4 muy separado filogenéticamente de los demás aislados mexicanos. Por todo lo expuesto anteriormente resultaría muy interesante caracterizar, tanto biológica, como epidemiológica y molecularmente, un mayor grupo de aislados del parásito provenientes del estado de Jalisco.

Hay que señalar que el dendograma nos da una idea de la relación entre los aislados, y no deben considerarse como definitivas las distancias encontradas, ya que un estudio formal de genética de población requiere de un muestreo rígido, donde todas las muestras sean recolectadas

dentro de un cierto periodo de tiempo y una región geográfica bien delimitada; lo que no es nuestro caso. Sin embargo, los resultados obtenidos son importantes ya que es la primera vez que se determina el zimodema de éstos aislados.

La estabilidad y reproducibilidad de los patrones isoenzimáticos son importantes si quieren usarse como marcadores genéticos, sobretodo cuando se trata de muestras que han sido mantenidas por largos periodos en cultivo. Algunos reportes indican que las características enzimáticas de aislados no clonados pueden variar con respecto al tiempo de cultivo. Lo anterior se debe seguramente a la existencia mezclas de poblaciones, que después de un tiempo en cultivo se seleccionan (Tibayrenc et.al., 1986; Solari et.al., 1992). Otros estudios reportan que los patrones isoenzimáticos permanecen constantes, después de 1, 2 y 3 años de mantenimiento en cultivo (Miles, 1980; Bogliolo y Godfrey, 1988). En nuestro caso los aislados se han mantenido en cultivo por 4 años en medio LIT, por lo que era importante demostrar la estabilidad de los patrones isoenzimáticos. Las clonas de referencia Silvio X10 cl1 y Esmeraldo cl3 con que cuenta el laboratorio, que han tenido las mismas condiciones y tiempo de cultivo que los demás aislados analizados, presentaron patrones isoenzimáticos similares a los que se han reportado anteriormente para éstas (Tibayrenc y Ayala, 1988). Como antes de éste estudio se desconocían los patrones isoenzimáticos de los aislados mexicanos analizados no es posible comprobar si hubo variabilidad en dichos patrones en el tiempo de cultivo, sin embargo a partir de ahora se podrá determinar si después de algún tiempo son estables los patrones isoenzimáticos.

Actualmente existe la tendencia a el uso de métodos de análisis directos del genoma en estudios de genética de poblaciones, evolución y taxonomía. La validez de éstos métodos de análisis debe ser determinada en parte mostrando su correlación con los resultados obtenidos por análisis isoenzimáticos. Análisis de hibridización de sondas con ADN del cinetoplasto, fragmentos de restricción polimórficos de ADN del cinetoplasto y de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, han mostrado correlacionar con los datos obtenidos por electroforésis enzimática, en protozoarios como *Leishmania* y *Trypanosoma* (Tibayrenc et.al., 1993; Bañuls, 1993; Sanchez et.al., 1993; Tarrieu, 1994). El RAPD es una metodología prometedora ya permite un análisis directo del genoma, no es necesaria información genómica previa del organismo a estudiar, es

posible encontrar marcadores filogenéticos y taxonómicos, y es menos costosa en tiempo y dinero que otros métodos de análisis genómico. En estudios con *T. cruzi* se han obtenido resultados por análisis de RAPD que correlacionan bien con los resultados por isoenzimas (Tibayrenc et al., 1993, Tarrieu, 1994).

En el análisis de RAPD la visualización de los productos de amplificación en los geles mostró también homogeneidad entre los aislados mexicanos, exceptuando a C4; aunque lógicamente mostró más variabilidad que el análisis isoenzimático, ya que el primero es un análisis directo del genoma mientras el segundo es un análisis indirecto.

En el análisis por RAPD hace falta determinar las sondas que son de utilidad en la detección de variabilidad, en éste caso para *T. cruzi*, y una vez determinadas se debe estandarizar su uso en análisis en laboratorios de distintas partes del mundo. En nuestro caso las sondas A1, A3, A4, A5, A17 y A19 fueron las que presentaron más bandas y también más variabilidad entre las diferentes cepas, y sondas como A8 que produce un sólo producto o A20 que produce 2, no fueron de gran utilidad en éste sentido, aunque corroboró que el perfil monomórfico de A8 es constante en la especie.

El dendograma obtenido de las distancias genéticas calculadas muestra las mismas ramificaciones principales que el dendograma de análisis de isoenzimas: un grupo de aislados mexicanos y los sudamericanos Y y Perú, otro de la clona Silvio X10 y el tercero de las clonas Esmeraldo y Santa Cruz 43 y el aislado mexicano C4. Al igual que el otro dendograma, C4 se encuentra más relacionado genéticamente con Santa Cruz 43 que con Esmeraldo, y también se encuentra muy alejado de los demás aislados mexicanos.

Actualmente C4 es estudiado más específicamente, para determinar si es de un zimodema ya descrito, o si constituye un nuevo zimodema. Deben analizarse por éstas técnicas (bajos las mismas condiciones para tener resultados comparables) más aislados mexicanos, para conocer más de la distribución de poblaciones genéticamente distintas, y estudiar al mismo tiempo características de importancia médica como la patología que producen o la resistencia a fármacos y demás características médicas.

En general en todos los estudios en este campo no es clara la correlación de la variabilidad genética y otras características de comportamiento del parásito, como aspectos clínicos y epidemiológicos; aunque se ha encontrado en algunos casos cierta correlación con los ciclos de transmisión (Miles, 1983) o la altitud del habitat natural (Tibeyrenc y Desjeux, 1983). Las consecuencias clínicas de la variabilidad genética son difíciles de evaluar, debido tal vez a infecciones mixtas en humanos, ya que se pueden encontrar 2 o más zimodemas en un huésped (Brenière et al., 1989).

En la teoría clonal propuesta por Tibayrenc es de esperarse que si una clona evolucionó independientemente de otra, la variabilidad genética y las características biológicas que presentan naturalmente correlacionen, lo cual sería muy conveniente ya que la caracterización molecular de aislados serviría en predicción, prevención y tratamiento de la enfermedad. Pero también es posible que la caracterización molecular tenga muy poca relación o ninguna, con las propiedades del parásito de interés médico, para lo que existen dos posibilidades: 1) las características de importancia médica están determinadas genéticamente por caracteres que no tienen que ver con los que se determinan en el análisis isoenzimático o por medio de las sondas en los RAPDs, y 2) las propiedades médicas y las estudiadas con isoenzimas o con sondas en los RAPDs, fueron expuestas a factores selectivos diferentes, por lo que no se ve correlación entre éstas (Tibayrenc et al., 1986, Tibayrenc y Ayala, 1988).

Por último es importante indicar que el estudio realizado produjo información molecular sobre 17 aislados mexicanos, de los cuales se cuenta con información de caracterización biológica "in vitro" (López, 1994) e "in vivo" (Caballero, comunicación personal), por lo que contamos con un grupo de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* con un buen nivel de caracterización.

VI. CONCLUSIONES

① El análisis isoenzimático reveló homogeneidad entre los aislados mexicanos de *T. cruzi*, los cuales están muy relacionados con la cepa de referencia Tehuantepec, zimodema 12; con excepción del aislado C4, que aparece más relacionado con los aislados sudamericanos.

② Por medio del análisis por RAPD se encontró homogeneidad entre los aislados mexicanos, que se encuentran muy relacionados con la cepa de referencia Tehuantepec. Al igual que en el análisis isoenzimático, C4 tuvo un comportamiento distinto al del grupo de los aislados mexicanos, y estuvo más relacionado con los aislados sudamericanos.

③ Los dendogramas obtenidos por medio del análisis isoenzimático y por RAPD tuvieron una misma organización general: tres ramificaciones principales, la primera que incluye a los aislados mexicanos, la segunda con la cepa de referencia Silvio X10, y una tercera que contiene al aislado C4 y las cepas sudamericanas de referencia SC43 y Esmeraldo. Por medio del análisis por RAPD se obtuvieron distancias genéticas mayores, debido a que es mucho más sensible para detectar variabilidad ya que se analiza de manera directa el genoma. Se corroboró entonces el valor del RAPD para realizar estudios filogenéticos de poblaciones en protozoarios.

④ Se puede asegurar la estabilidad de los aislados, por lo menos durante los 4 años que llevan en cultivo en el laboratorio, ya que las cepas de referencia con que se contaba dieron perfiles isoenzimáticos similares a los que han sido reportados para éstas cepas anteriormente.

⑤ No se encontró correlación entre los datos genéticos obtenidos en este estudio y otras características, como origen, crecimiento o infectividad *in vitro*.

⑥ Se cuenta con un grupo de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* con un buen nivel de caracterización, ya que se han analizado tanto a nivel biológico como a nivel genético.

BIBLIOGRAFIA

Abderrazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabé, C. y Tibairenc, M. (1993), Isoenzyme Electrophoresis for Parasite Characterization. En: Hyde, J.E. (Ed), *Methods in Molecular Biology: Protocols in Molecular Parasitology*. Vol. 21. Humana Press Inc. NJ. U.S.A.

Andersson, N., Morales, A., Nava, E., Martínez, E., Rodríguez, I., Young, P., Howard, M. K. y Miles, M. A. (1990), *Trypanosoma cruzi* Infection in the Mexican State of Guerrero: A Seroepidemiological (ELISA) Survey of 20 Communities. *J. Trop. Med. Hyg.* **93**: 341-346.

Bañuls, A. L. (1993), Analyse Génétique d'Isoiats Naturels Sud-Américains de *Leishmania* Montrant de Possibles Phénomènes de Recombinaison. DEA. Centre de Recherche ORSTOM. France.

Bello, P. Y. (1992), Participation Communautaire et Enquete Epidémiologique: à Propos d'une Étude de la Prevalence de la Séroposivité Contre *T. cruzi* dans un Quartier Périphérique de Matagalpa (Nicaragua). Thèse Doctotal. Faculté de Medicine. Sait-Antoine, Paris.

Bogliolo, A. y Godfrey, D. (1987), Isoenzyme Changes During the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **81**: 222-229.

Brabin, L., (1993), *Trypanosoma cruzi* Infection in Women. *Parasitology Today*. **9**: 198-199.

Brenière, S.F., Carrasco, R., Revolto, S., Aparicio, O., Desjeux, P y Tibayrenc, M. (1989), Chagas' Disease in Bolivia: Clinical and Epidemiological Features and Zymodeme Variability of *Trypanosoma cruzi* Strains Isolated from Patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **5**: 521-529.

Cazzulo, J. J. (1992a), Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. En: Avila, J.L. y Harris, J.R. (Eds), *Subcell Biochemistry: Intracellular Parasites*. Vol. 18. Plenum Press, N.Y., U.S.A., pp. 235-257.

Cazzulo, J. J. (1992b), Aerobic Fermentation of Glucose by Trypanosomatids. *FASEB J.* **6**: 3153-3161.

Cerrone, M. C. y Kuhn, R. E. (1991), Macrophage Regulation of Immune Responses of Spleen Cells from Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Immunol.* **138**: 423-436.

Chagas, C. (1909), Nova especie morbida do homen, produzida por um trypanozoma (trypanozoma Cruzi). *Brasil-Medico.* **16**: 155 .

Chagas, C. (1909), Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfollia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen., n.sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homen. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* **1**: 159-218.

Chagas, C. (1910). Nova entidade morbida do homen. *Brasil-Medico.* **44**: 433-437.

Chapman, M. D., Baggaley, R. C., Godfrey-Fausttet, P. F., Malpas, T. J., White, G., Canese, J. y Miles, M. (1984), *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: Izoenzyme Profiles of Strains Isolated at Mathalawaiya. *J. Protozool.* **31**: 482-486.

- Dvorak, J. A. (1984), The Natural Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* : Biological and Medical Implications. *J. Cell. Biochem.* **24**: 357-371.
- Dvorak, J. A., Engel, J. C., Leapman, R. D., Swyt, C. R. y Pella, P. A. (1988), *Trypanosoma cruzi*: Elemental Composition Heterogeneity of Cloned Stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**: 19-26.
- Flint, J. E., Schechter, M.D., Chapman y Miles, M.A. (1984), Zymodeme and Species Specificities of Monoclonal Antibodies Raised Against *Trypanosoma cruzi*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **78**:193-202.
- Galván, S. G., Rubio, J., Sánchez, R., Ortega, J. y Castañeda, M. (1983), Phenetic Variation in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Isolates. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**: 573-578.
- Goldsmith, R. S., Zárate, R., Kagan, I., Cedeño, F. J., Galindo, V. M. y Paz, E. A. (1978), El Potencial de la Transmisión en la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea: Hallazgos Serológicos Entre Donadores en el Estado de Oaxaca. *Sal. Púb. Mex.* **20**: 439-444.
- Goldsmith, R. S., Zárate, R., Zárate, L. G., Morales, G., Kagan, I., Drickey, R. y Jacobson, L. B. (1992), Clinical and Epidemiologic Studies of Chagas' Disease in Rural Communities of Oaxaca, Mexico, and an Eight-year Followup: II. Chila. *Bull. PAHO.* **26**: 47-58.
- Hadrys, H., Balick, M. y Schierwater, B. (1992). Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. *Molecular Ecology.* **1**: 55-63.
- Hedrick, P. (1992), Shooting the RAPDs. *Nature.* **355**: 679-680.
- Hudson, L. y Britten, V. (1985), Immune Response to South American Trypanosomiasis and its Relationship to Chagas' Disease. *British Med. Bull.* **41**: 175-180.
- Jaccard, P. (1908), Nouvelles Recherches sur la Distribution Florale. *Bull. Soc. vaudoise Sci. Nat.*, **44**: 223-270.
- Kierzenbaum, F., Rodriguez de Cuna, W., Beltz, L. A. y Szein, M. B. (1989), *T.cruzi* Reduces the Number of High-Afinity IL-2 Receptors on Activated Human Lymphocytes by Suppressing the Expression of the p55 and p70 Receptor Component. *J. Immunol.* **143**: 275-281.
- Lanham, S. M., Grendon, J. M., Miles, M. A., Pova, M. M. y De Souza, A. A. (1981), A Comparison of Electrophoretic Methods for Isoenzyme Characterization of Trypanosomatids. Y: Standard Stocks of *Trypanosoma cruzi* Zymodemes from Northeast Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 742-750.
- Lewinsohn, R. (1979), Carlos Chagas: The Discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**: 513-523.
- López, O. V. (1994), Caracterización Biológica *in vitro* de 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Ciencias. U.N.A.M. México, D.F.

Luquelli, A.O., Miles, M. A., Rassi, A., De Rezende, J. M., De Souza, A. A., Póvoa, M. M. y Rodrigues, J. (1986), *Trypanosoma cruzi*: Zymodemes Associated with Acute and Chronic Chagas' Disease in Central Brazil. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **80**: 462-470.

Micheli, M. R., Bova, R., Calissano, P. y D'Ambrosio, E. (1993), Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting Using Combinations of Oligonucleotide Primers. *BioTechniques.* **15**: 388-389.

Micheli, M. R., Bova, R., Pascale, E. y D'Ambrosio, E. (1994), Reproducible DNA Fingerprinting with the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Method. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1921-1922.

Miles, M. A. (1983), The Epidemiology of South American Trypanosomiasis - Biochemical and Immunological Approaches and their Relevance to Control. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **77**: 5-23.

Miles, M. A. (1985), Isozyme Characterization. *Rev.Soc.Brasil.Med.Trop.* **18** (Suplemento): 53-59.

Miles, M. A., Apt B. W., Widmer, G., Póvoa, M. M. y Schofield, C. J. (1984), Isoenzyme Heterogeneity and Numerical Taxonomy of *Trypanosoma cruzi* Stocks from Chile. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **78**: 526-535.

Miles, M.A., Lanham, S., De Souza, A. y Póvoa, M. (1980), Further Enzymic Characters of *Trypanosoma cruzi* and their Evaluation for Strain Identification. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **74**: 221-237.

Miles, M. A., Póvoa, M. M., Prata, A., Cedillos, R. A., De Souza, A. A. y Macedo, V. (1981), Do Radically Dissimilar *Trypanosoma cruzi* Strains (Zymodemes) Cause Venezuelan and Brazilian Forms of Chagas' Disease? *The Lancet.* 1338-1340.

Miles, M. A., Toye, P. J., Oswald, S. C. y Godfrey, D. G. (1977), 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.* **71**: 217-225.

Moncayo, A. (1992), Chagas' Disease: Epidemiology and Prospects for Interruption of Transmission in the Americas. *Rapp. Trimest. Sanit. Mond.* **45**: 276-279.

Morris, S. A., Tanowitz, H. B., Bilezikian, J. P. y Wittner, M. (1991), Modulation of Host Cell Metabolism by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* **7**: 82-87.

Morris, S. A., Tanowitz, H., Makman, M., Hatcher, V. B., Bilezikian y Wittner, M. (1992), *Trypanosoma cruzi*: Alteration of cAMP Metabolism following Infection of Human Endothelial Cells. *Exp. Parasitol.* **74**: 69-76.

Ortega, C. J. (1980), Determinación Electroforética de Patrones Isoenzimáticos de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Química, U.N.A.M. 48pp.

Parham, P. (1992), Chagas' Disease. Defence Cuts Begin to Bite. *Nature.* **356**: 291-292.

Pereira, M. (1990), Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. En: Wyler, D. (Eds), Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological and Molecular Aspects. W.H. Freeman and Company, U.S.A., pp. 64-78.

Pereira, M. E. y Hoff, R. (1986), Heterogeneous Distribution of Neuraminidase Activity in Strains and Clones of *Trypanosoma cruzi* and its Possible Association with Parasite Myotropism. Mol. Biochem. Parasitol. **20**: 183-189.

Petry, K. y Eisen, H. (1989), Chagas' Disease: a Model for the Study of Autoimmune Diseases. Parasitology Today. **5**: 111-115.

Pollard, V.W., Rohner, S.P., Michelotti, E.F., Hancock, K. y Hajduk, S.L. (1990), Organization of Minicircle Genes for Guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. Cell. **63**: 783-790.

Ready, P. D. y Miles, M. A. (1979), Delimitation of *Trypanosoma cruzi* Zymodemes by Numerical Taxonomy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **74**: 238-243.

Reyes, P., Mendoza, C. M., Marcuschamer, J. y Garcia, C. Z. (1983), Miocardiopatía Congestiva y Tripanosomiasis Americana. Sal. Páb. Mex. **25**: 139-144.

Rodríguez de Cuna, C., Kierszenbaum, F. y Wirth, J. J. (1991), Binding of the Specific Ligand to Fc Receptors on *Trypanosoma cruzi* Increases the Infective Capacity of the Parasite. Immunology. **72**: 114-120.

Salazar, S. P., Arteaga, I. y Uribarren, B. T. (1988), Chagas' Disease in Mexico. Parasitology Today. **4**: 348-352.

Salazar, S. P., Arteaga, I., Jiménez, M. J. y García, C. E. (1983), Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal. Páb. Mex. **25**: 77-82.

Santos-Buch, A. y Acosta, A. (1992), Pathology of Chagas' Disease. En: Tizarol, I. (Ed), Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. C. R.C. Press, U.S.A., pp. 149-183.

Sanchez, G., Wallace, A., Muñoz, S., Venegas, J., Ortiz, S. y Solari, A. (1993) Characterization of *Trypanosoma cruzi* Populations by Several Molecular Markers Supports a Clonal Mode of Reproduction. Biol. Res. **26**: 167-176.

Saravia, N., Holguín, A., Cibulskis, R. y D'Alessandro, A. (1987) Divergent Isoenzyme Profiles of Sylvatic and Domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern Plains, Piedmont and Highlands of Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**: 59-69.

Schaub, G. A. (1989), Does *Trypanosoma cruzi* Stress its Vectors? Parasitology Today. **5**: 85-188.

Seebeck, T., Hemphill, A. y Lawson, D. (1990), The Cytoskeleton of Trypanosomes. Parasitology Today. **6**: 49-52.

Snary, D. (1985), Receptor and Recognition Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **79**: 587-590.

Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Apt, Brenlére, S., y Tibayrenc, M. (1992), Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinian *Trypanosoma cruzi* Populations by Restriction Endonuclease and Isoenzyme Analysis. *Exp. Parasitol.* **75**: 187-195.

Tanowitz, H. B., Gumprecht, J. P., Spurr, D., Calderon, T. M., Ventura, M. C., Raventos-Suarez, C., Kellie, S., Factor, S. M., Hatcher, V. B., Wittner, M. y Berman, J. W. (1992), Cytokine Gene Expression of Endothelial Cells Infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Diseases.* **166**: 598-603.

Tanowitz, H. B., Kirchoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M. y Wittner, M. (1992), Chagas' Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 400-419.

Tarnieu, F. (1994), Valeur des Marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans l'étude de la Microvariabilité d'un Cloné Majeur de *Trypanosoma cruzi*, Agent de la Maladie de Chagas. DEA. Centre de Recherche ORSTOM, Montpellier, France.

Tay, J., Schenone, H., Sánchez, J. T. y Robert, L. (1992), Estado Actual de los Conocimientos sobre la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* **47**: 43-53.

Taylor, M. B. y Gutteridge, W. E. (1987), *Trypanosoma cruzi*: Subcellular Distribution of Glycolytic and Some Related Enzymes of Epimastigotes. *Exp. Parasitol.* **63**: 84-97.

Thompson, R. y Lymberry, A. (1990), Intraspecific Variation in Parasite-What is a Strain? *Parasitology Today.* **6**: 345-348.

Tibayrenc, M. (1979) Les Isoenzymes et l'Entomologie Médicale. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.* **XVII**:249-256.

Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (1988), Isoenzyme Variability in *Trypanosoma cruzi*, The Agent of Chagas' Disease: Genetical, Taxonomical, and Epidemiological Significance. *Evolution.* **42**: 277-292.

Tibayrenc, M. y Desjeux, P. (1983), The Presence in Bolivia of Two Distinct Zymodemes of *Trypanosoma cruzi*, Circulating Sympatrically in a Domestic Transmission Cycle. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 73-75.

Tibayrenc, M., Echalar, L., Dujardin, J. P., Pouch, O. y Desjeux, P. (1984), The Microdistribution of Isoenzymic Strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia; New Isoenzymic Profiles and Further Arguments Against Mendelian Sexuality. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 519-525.

Tibayrenc, M., Hoffmann, A., Poch, O., Echalar, L., Le Pont, F., Lemesre, J. L., Desjeux, P., y Ayala, F. J. (1986), Additional Data on *Trypanosoma cruzi* Strains Encountered in Bolivian Domestic Transmission Cycles. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 442-447.

Tibayrenc, M. y Le Ray, D. (1984), General Clasificación of the Isoenzymic Strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Comparison with *T.(S.) C. Marinkelleli* and *T. (Herpetosoma) Rangeli*. Ann. Soc. Belge. Méd. Trop. **64**: 239-248.

Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. y Ayala, F. (1993), Genetic Characterization of Six Parasitic Protozoa: Parity Between Random-Primer DNA Typing and Multilocus Enzyme Electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**: 1335-1339.

Urbina, J. A. (1994), Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Today. **10**: 107-110.

Urbina, J. A., Osorno, C. E. y Rojas, A. (1990), Inhibition of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Epimastigotes by 3-Mercaptopicolinic Acid: *in Vitro* and *in Vivo* Studies. Arch. Biochem. Biophys. **282**: 91-99.

Velasco, C. O. (1992), La Enfermedad de Chagas en México. Infectología. **12**: 783-791.

Velasco, C. O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. (1992), Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas. Sal. Púb. Mex. **34**: 186-196.

Vickerman, K. (1976), The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. En Lumsden, W. H. R. y Evans, D.A. (Eds.), Biology of the Kinetoplastida. Vol. 1, Academic. N.Y., U.S.A. , pp. 1-34.

Wagner, W. y So, M. (1990), Genomic Variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of Multicopy Genes. Infect. Immunol. **58**: 3217-3224.

Welsh, J. y McClelland, M. (1990), Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. Nucleic Acids Res. **18**: 7213-7218.

Welsh, J. y McClelland, M. (1991), Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed PCR and Matrix of Pairwise Combinations of Primers. Nucleic Acids Res. **19**: 5275-5279.

WHO (1986), Epidemiology and Control of African Trypanosomiasis: Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series No. **739**, Genève.

WHO (1991), Control of Chagas Disease: Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series No. **811**, Genève.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. (1990), DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. **18**: 6531-6535.

Zavala, C. J., Velasco, C. O. y Hernández, R. (1992), Molecular Characterization of Mexican Stocks of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. **47**: 201-209.

Zeledon, R. y Rabinovich, J. E. (1981), Chagas' Disease: An Ecological Appraisal with Special Emphasis on its Insect Vectors. Ann. Rev. Entomol. **26**: 101-103.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO I. SISTEMAS ENZIMATICOS.

6PGDH	Código : E.C.1.1.1.44	Nombre: 6-fosfogluconato deshidrogenasa.
Reacción:	$6\text{-fosfato-D-gluconato} + \text{NADP}^+ = \text{D-ribulosa-5-fosfato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$	
ACON	Código: E.C.4.2.1.3	Nombre: Aconitasa.
Reacción:	Citrato = <i>cis</i> -aconitato + H ₂ O	
ALAT	Código: E.C.2.6.1.2	Nombre: Alanina amino transferasa.
Reacción:	L-alanina + a ácido2-oxo = piruvato + L-aminoácido	
DIA	Código: E.C.1.6.99.1	Nombre: Diaforasa.
Reacción:	NADPH + aceptor = NADP ⁺ + aceptor reducido	
G6PDH	Código: E.C.1.1.1.49	Nombre: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
Reacción:	D-glucosa-6-fosfato + NADP ⁺ = D-glucano-1,5-lactona 6-fosfato + NADPH	
GAPD	Código : E.C.1.2.1.12	Nombre:Gliceraldeido-3-fostato deshidrogenasa.
Reacción:	D-gliceraldehído-3-fosfato + ortofosfato + NAD ⁺ = 3-fosfato-D-gliceroilfosfato + NADH	
GDH	Código : E.C.1.4.1.3	Nombre: Glutamato deshidrogenasa.
Reacción:	L-glutamato + H ₂ O + NAD(P) ⁺ = 2-oxoglutarato + NH ₃ + NAD(P)H	
GOT	Código : E.C.2.6.1.1	Nombre:Glutámico-oxaloacético transaminasa ó aspartato transaminasa.
Reacción:	L-aspartato + 2-oxoglutarato = oxaloacetato + L-glutamato	
GPI	Código : E.C.5.3.1.9	Nombre: Gucosa-6- fosfato isomerasa.
Reacción:	D-glucosa-6-fosfato = D-fructosa-6-fosfato	
IDH	Código : E.C.1.1.1.42	Nombre: Isocitrato deshidrogenasa.
Reacción:	Isocitrato + NADP ⁺ = 2-oxoglutarato + CO ₂ + NADPH	
LAP	Código : E.C.3.4.11.1	Nombre: Leucina amonopeptidasa.
Reacción:	Liberación de un aminoácido N-terminal, preferentemente Leu.	
MDH	Código : E.C.1.1.1.37	Nombre: Malato deshidrogenasa.
Reacción:	(S) malato + NAD ⁺ = oxaloacetato + NADH	

ME	Código : E.C.1.1.1.40	Nombre: Enzima málica.
Reacción:	(S) malato + NADP ⁺ = piruvato + CO ₂ + NADPH	
MPI	Código : E.C.5.3.1.8	Nombre: Manosa-6-fosfato isomerasa.
Reacción:	D-manosa-6-fosfato = D-fructosa-6-fosfato	
NHi	Código : E.C.3.2.2.2	Nombre: inosina nucleosidasa.
Reacción:	Inosina + H ₂ O = Hipoxantina + D-ribosa	
PEP 1	Código : E.C.3.4.22.3	Nombre: Peptidasa 1 (Ficaina)
Reacción:	Liberación de aminoácido N-amino terminal, principalmente Leu	
PEP 1+2	Código : E.C.3.4.13.8	Nombre: Peptidasa 2
Reacción:	Dipeptidasa citoplasmática no específica.	
PGM	Código : E.C.5.4.2.2	Nombre: Fosfoglucomutasa.
Reacción:	D-glucosa-1-fosfato = α-D-glucosa-6-fosfato	
SOD	Código: E.C.1.15.1.1.	Nombre: Superóxido dismutasa.
Reacción:	O ₂ ^{·-} + O ₂ ^{·-} + 2H ⁺ = O ₂ + H ₂ O ₂	

ANEXO II . PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de fenol.- Se realiza bajo campana de extracción

Solubilizar el fenol (MERCK) calentando la botella a 65°C; agregar TRIS 500mM pH8 a saturación, agitar 15 min y dejar decantar. Cuando se forman dos fases y se retira el sobrenadante y se satura nuevamente el fenol con TRIS 100mM pH8, hasta que el pH de la fase fenólica sea igual 7.6. Se agrega 0.1 volúmen de amortiguador TE pH8 en 1 volúmen de fenol y 8-hidroxiquinoleína al 0.1% del volúmen final, mezclar y añadir β -mercaptoetanol al 0.2% del volúmen final. Dejar reposar una noche a 4°C. Conservar en refrigeración y oscuridad.

Solución de cloroformo.- Se realiza bajo campana de extracción

Mezclar 1 volúmen de alcohol isoamílico en 24 volúmenes de cloroformo (MERCK).

AMORTIGUADORES USADOS EN LA ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS:

Shaw N°I.- Tris 16.35 g , ácido cítrico 9.04 g y agua destilada cbp 1 litro. Ajustar un pH=7.

Shaw N°III.- Tris 60.6 g , ácido bórico 40 g , EDTA 6g y agua destilada cbp 1 litro. Verificar pH=8.

SOD.- Tris 0.1 M , ácido bórico 0.3 M , sacarosa 10 g y agua destilada cbp 1 litro. Verificar pH=7.6.

Kreutzer N°III.- Tris 0.1 M , ácido maleico 0.1 M , EDTA 2.92 g , $MgCl_2$ 0.01M y agua destilada cbp 1 litro. Verificar pH=7.4.

Lanham N°2.- Tris 0.66 M y ácido cítrico anhidro 0.083 M. Verificar pH=8.6.

Richardson Dx2.- Tris 30 mM , EDTA 10 mM , $MgCl_2$ 20 mM y ácido bórico 10 mM. Verificar pH=7.8.

HR.- Tres paquetes de medio HR (HELENA Laboratories) y agua destilada cbp 2 litros, pH=9 espontáneo.

SOLUCIONES DE COLORACIÓN ESPECÍFICAS PARA LA REVELACIÓN DE LAS ENZIMAS

6PGDH	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH8 1M. Sustrato - 10 mg ácido 6-fosfogluconico. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M.	Agua destilada cbp 10 ml. Coenzimas - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
ACON	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH8 1M. Sustrato - 20 mg ácido cis-aconítico. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M. Agua destilada cbp 10 ml.	Enzima de ligación - 2 UI isocitrato deshidrogenasa. Coenzima - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
ALAT	Amortiguador - 10 ml amortiguador ALAT : 0.75 g Na ₂ HPO ₄ , 2.84 g Na ₂ HPO ₄ , agua cbp 250ml, pH 7.4. Sustrato - 5 mg ácido α-cetoglutarico. Enzimas de ligación - 20 UI lactato deshidrogenasa.	Coenzima - 100 µl NADH sal de disodio 40 mg/ml. Revelar con luz UV
DIA	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl pH8 0.1M. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M.	Coenzimas - 100 µl NADPH sal tetrasódica 40 mg/ml, 100 µl NADH sal disódica 40 mg/ml. Colorante - 200 µl NBT 25 mg/ml.
G6PDH	Amortiguador - 5 ml Tris-HCl pH7 1M. Sustrato - 10 mg glucosa-6-fosfato. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M.	Agua destilada cbp 10 ml. Coenzima - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml, 100 µl PMS 30 mg/ml.
GAPD	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH7 1M. Sustrato - 12.5 mg fructosa-1-6-difosfato sal tetrasódica. Activadores - 0.6 mg ácido arsénico sal disódica, 5 mg piruvato de sodio. Agua destilada cbp 10 ml.	Enzima de ligación - 2.5 UI Aldolasa. Coenzima - 100 µl NAD 40 mg/ml. Incubar 30 min a 37 °C y agregar al final los colorantes Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
GDH	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl pH8 1M. Sustrato - 170 mg ácido glutámico,	Coenzimas - 100 µl NADP 50 mg/ml , 120 µl NAD 40 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
GOT	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl pH8 0.1M. Sustrato - 30 mg ácido L-aspartico, 25 mg ácido α-cetoglutarico.	Activador - 5 mg Piridoxal-5-fosfato. Colorante - 20 mg fast blue BB.
GPI	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH7 1M. Sustrato - 10 mg fructosa-6-fosfato. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M. Agua destilada cbp 10 ml.	Enzimas de ligación - 5 UI glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Coenzimas - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.

IDH	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl pH8 0.1M. Sustrato - 10 mg ácido isocítrico. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M.	Coenzima - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
LAP	Amortiguador - 10 ml amortiguador LAP:Tris 0.2M, ácido málico 0.2M. Sustrato - 15 mg L-leuc-β-naftilamida	Colorante - 200 mg Fast black salt
MDH	Amortiguador - 1 ml Tris-HCl pH8 1M. Sustrato - 900 µl malato pH7 1M. Agua destilada cbp 10 ml.	Coenzima - 100 µl NAD 40 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml, 100 µl PMS 30 mg/ml.
ME	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH7 1M. Sustrato - 600 µl Malato pH7 1M. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M.	Agua destilada cbp 10ml. Coenzima - 100 µl NADP 50mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
MPI	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH7 1M Sustrato - 20 mg manosa-6-fosfato. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M. Agua destilada cbp 10 ml	Enzimas de ligación - 8 UI glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, 8 UI glucosa-6-fosfato isomerasa. Coenzimas - 100 µl NADP 50 mg/ml Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
NHI	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl 0.1M pH 8. Sustrato - 40 mg Inosina.	Enzimas de ligación - 1.5 UI Xantina oxidasa. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
PEP 1	Amortiguador - 10 ml Tris-HCl 0.1M pH 8. Sustrato - 5 mg Leu-leu-leu. Activadores - 150 µl MgCl ₂ 1M , 150 µl MnCl ₂ 0.1M.	Enzimas de ligación - 100 µl ácido L-amino oxidasa 100 mg/ml, 100 µl peroxidasa 10 mg/ml. Colorante - 40 mg 3-amino etil carbazol
PEP 1+2	Mismos reactivos que PEP 1, excepto el sustrato que en este caso es 5 mg Leu-ala , 5 mg Leu-leu-leu.	El colorante para PEP 1 y PEP 1+2 se prepara junto. Se agrega al colorante 1ml de etanol, se deja decantar y el sobrenadante se reparte mitad y mitad en cada solución reveladora.
PGM	Amortiguador - 2.5 ml Tris-HCl pH8 1M. Sustrato - 20 mg glucosa-1-fosfato. Activador - 250 µl MgCl ₂ 1M. Agua destilada cbp 10 ml.	Enzimas de ligación - 8 UI glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Coenzimas - 100 µl NADP 50 mg/ml. Colorantes - 200 µl NBT 25 mg/ml , 100 µl PMS 30 mg/ml.
SOD	Amortiguador - 10 ml amortiguador de fosfato pH7.5 0.1M : 0.12 g NaH ₂ HPO ₄ . Sustrato - Riboflavina al 0.0032%	Activador - 100 µl EDTA 200 mM. Colorante - 500 µl iodo nitro tetrazolium (INT) 10 mg/ml.

Nota : Todos los reactivos son SIGMA.

ANEXO III . CONDICIONES DE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS.

ENZIMA	Amortiguador de impregnación	Amortiguador de migración	Voltage (voltios)	Tiempo (minutos)	Sistema refrigerante
6PGDH	Shaw N°I 25%	Shaw N°I	160	30	hielo
ACON	HR 50%	HR	160	20	hielo
ALAT	Lanham N°2 25%	LanhamN°2	200	20	hielo
DIA	Shaw N°III 50%	Shaw N°III	200	20	hielo
G6PDH	HR	HR	200	20	agua
GAPD	Shaw N°III 25%	Shaw N°III	200	30	hielo
GDH	Shaw N°III 25 %	Shaw N°III	160	30	agua
GOT	Shaw N°III 50%	Shaw N°III	160	30	agua
GPI	Shaw N°III 20%	Shaw N°III	200	20	agua
IDH	Shaw N°III 30%	Shaw N°III	200	20	hielo
LAP	Shaw N°III 30%	Shaw N°III	160	20	hielo
MDH	Shaw N°III	Shaw N°III	200	30	hielo
ME	Shaw N°III 25 %	Shaw N°III	160	30	agua
MPI	HR 50%	HR	200	20	hielo
NHi	RDx2 75%	RDx2	160	20	hielo
PEP 1	HR	HR	200	25	agua
PEP 1+2	HR	HR	200	25	agua
PGM	Kreutzer N°III 15%	Kreutzer N°III 60%	200	20	hielo
SOD*	SOD	SOD	300	30	hielo

* El depósito de la muestra es central. En todos los demás sistemas el depósito es catódico.

ANEXO IV. SECUENCIA DE LAS SONDAS PARA RAPD.

SONDA	SECUENCIA
A-01	5'CAGGCCCTTC
A-02	5'TGCCGAGCTG
A-03	5'AGTCAGCCAC
A-04	5'AATCGGGCTG
A-05	5'AGGGGTCTTG
A-06	5'GGTCCCTGAC
A-07	5'GAAACGGGTG
A-08	5'GTGACGTAGG
A-09	5'GGGTAACGCC
A-10	5'GTGATCGCAG
A-15	5'TTCCGAACCC
A-17	5'GACCGCTTGT
A-19	5'CAAACGTCCG
A-20	5'GTTGCGATCC