

Estudio de la inserción de ADN_k de *Trypanosoma cruzi* en el genoma de pacientes con enfermedad de Chagas

CAROLINA CHACÍN¹, RODRIGO GONZALO TORRES²

Resumen

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

Objetivo: Este estudio consistió en determinar si ocurre inserción del kDNA del *Trypanosoma cruzi I* en el genoma de pacientes chagásicos del área endémica de Santander (Colombia) a partir de muestras de ADN extraído de sangre periférica.

Metodología: Se tuvieron en cuenta 130 muestras provenientes de pacientes sintomáticos, así como 50 muestras provenientes de pacientes asintomáticos, las cuales fueron analizadas mediante la técnica de PCR con los pares de cebadores Tcz1/Tcz2 y S35/S36 con el fin de identificar la presencia del parásito en dichas muestras.

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

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

Palabras clave: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, ADN.

1 Química y física, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

2 Bioquímico, Ph.D., profesor, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Entidad financiadora: Dirección de Investigación y Extensión, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia,

Recibido: 26-11-2009

Revisado: 17-05-2010

Aceptado: 15-07-2010

Title

Study of *Trypanosoma cruzi*'s kDNA insertion into the genome of chagasic patients

Abstract

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

Objective: This study consisted in determining if the kDNA of *T. cruzi I* is inserted into the genome of chagasic patients from the endemic area of Santander (Colombia), specifically in DNA extracted from samples of peripheral blood.

Methodology: One hundred and thirty samples from symptomatic patients and 50 samples from asymptomatic patients were considered for this study; all of them were analyzed by PCR technique with primers Tcz1/Tcz2 and S35/S36 with the purpose of identifying the parasite's presence in these samples.

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

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

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, ADN.

Introducción

La enfermedad de Chagas afecta a cerca de 20 millones de personas y es originaria del continente americano. Esta enfermedad de carácter crónico, es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, del cual, en la actualidad, se han definido dos poblaciones: *T. cruzi I* y *T. cruzi II*, con características particulares relacionadas con el tipo de manifestaciones clínicas y la distribución geográfica: *T. cruzi II* es propio de regiones de Brasil y Argentina, mientras que *T. cruzi I* es característico de regiones de Colombia y Venezuela[1].

Trypanosoma cruzi pertenece a la familia Trypanosomatidae, la cual está incluida en el orden Kinetoplastida que, junto con los euglenoides, representan el linaje más antiguo de los organismos eucariotas que contienen mitocondrias.

Una característica biológica especial de los tripanosomátidos es que tienen un ADN mitocondrial denominado cinetoplasto (ADN_k), el cual está compuesto por dos tipos de ADN circular: maxicírculos y minicírculos, los cuales se concatenan entre sí, formando una red compleja.

Los minicírculos se caracterizan por ser moléculas que poseen una longitud entre 100 y 2.500 bp y, además, codifican pequeños ARN que dirigen

el procesamiento (por edición) de ARN mitocondriales (ARN_{mt}) codificados por los maxicírculos. Al llevar a cabo esta función, los minicírculos contribuyen en forma importante al enorme contenido y heterogeneidad en el componente de ARN_{mt} de estos parásitos. Cabe resaltar que la organización de los minicírculos en *T. cruzi* está muy conservada en ambos linajes, siendo así que ambos poseen moléculas que tienen igual número y longitud de las regiones conservadas y variables[2].

Por su parte, los maxicírculos son moléculas mayores de ADN, que contienen una longitud entre 30.000 y 50.000 bp, y son homólogos al ADN mitocondrial eucariota. Se encuentran en mucho menor número que los minicírculos (unas pocas docenas por célula) y contienen los genes que codifican los ARN ribosómicos (ARN_r), entre otros genes que codifican subunidades de las enzimas implicadas en el proceso de respiración, tales como las subunidades II y III (COII y COIII) de la enzima citocromo-C-oxidasa, la subunidad 7 (ND7) de la NADH deshidrogenasa y la subunidad 6 (A6) de la enzima ATPasa.

Se han comparado las secuencias de los genes mitocondriales con los ARN codificados por ellos y se encontró que no corresponden íntegramente, siendo así que los ARN contenían

residuos de uridina internos adicionales a los esperados por la secuencia génica que los codificó. Con menor frecuencia, también se han encontrado residuos de uridina faltantes en el ARN. De esta forma, se descubrió uno de los fenómenos más interesantes de la biología de los tripanosomas: la edición posterior a la transcripción de sus ARN mensajeros mitocondriales. Dada la importancia de este proceso de edición, la posibilidad de inhibirlo puede llegar a ser una estrategia para detener el desarrollo del parásito[3].

En un estudio reciente se investigaron los perfiles de la transcripción diferencial en *T. cruzi* asociados a las formas clínicas de la enfermedad de Chagas, y se encontró que el maxicírculo que codifica la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa (ND7) presenta una delección de 455 bp en las muestras de hemocultivo de pacientes asintomáticos. Esta lesión en la estructura del gen de ND7 da lugar a un ARN_m truncado que, a su vez, puede alterar la función del complejo mitocondrial del parásito. Los autores de este estudio concluyeron que la ND7 puede funcionar como marcador molecular de potencial interés para el diagnóstico de muestras aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas, siendo así que aquellas muestras que presenten la delección en ND7 corresponden a la fase asintomática de la enfermedad[4].

Teixeira *et al.* han postulado que el ADN_k presenta la facultad de transferirse al genoma de las células afectadas del huésped[5]. Se han realizado varios estudios interesantes acerca de la transponibilidad del ADN_k en los genomas de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Brasilia. En uno de estos estudios, hicieron una comparación de la inserción del ADN_k en el genoma presente en las muestras de sangre de 13 pacientes con enfermedad de Chagas crónica (todos ellos habían portado el parásito por más de 30 años), para determinar si realmente existía transferencia genética horizontal de ADN de *T. cruzi* hacia organismos de diferente reino.

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

Además de comprobar la transferencia genética de *T. cruzi* a humanos, se reprodujo experimentalmente esta transferencia en conejos y pollos. El ADN_k estuvo presente en los genomas de ocho conejos infectados crónicamente (entre 6 meses y 3 años). El ADN se extrajo de muestras de tejido cardíaco, muscular, intestinal, hepático, renal y sanguíneo, los cuales se hibridaron con una región de 122 bp del minicírculo del ADN_k. En los pollos, se observó una línea germinal que heredó el ADN_k insertado en el genoma de los progenitores, en total ausencia de infección persistente.

Los autores de este estudio llegaron a la conclusión de que quizás el problema más importante en el campo de la investigación de la enfermedad de Chagas sea la determinación de la patogénesis durante la fase crónica. A partir de esta idea, proponen la posibilidad de que la inserción del ADN_k induzca una mutación génica, la cual sería causante de la producción de proteínas quiméricas que, a su vez, serían las responsables directas de la respuesta autoinmunitaria[6].

Posteriormente, estos mismos investigadores postularon en otro estudio que dicha inserción podía movilizarse a través del genoma del huésped. Para ello, cultivaron una línea de macrófagos humanos que fueron infectados con *T. cruzi* y se

observó que las células infectadas recientemente (a los siete días de infección) presentaban bandas de 1.200, 1.800 y 2.200 bp, además de la banda de 360 bp del ADN_k de *T. cruzi*. Por otra parte, en las células que tenían 30 días de haber sido infectadas, no se encontró la banda de 360 bp, pero, las demás bandas sí y en mayor intensidad, es decir, en mayor cantidad. Luego, se tomaron algunas de estas últimas muestras para clonarlas y secuenciarlas, y se encontró que contenían la secuencia correspondiente a una región de uno de los minicírculos del ADN_k de *T. cruzi*: la secuencia S36. Se utilizó también la técnica de *Southern blot* para analizar dichas muestras y se observó que sus fragmentos hibridaban con la sonda L1, una secuencia de oligonucleótidos correspondiente al retroposón LINE-1 del genoma humano. Por lo tanto, se verificó que la secuencia S36 se había insertado en el retroposón LINE-1 del ADN de los macrófagos y que, de esta manera, se podía seguir movilizándolo a través del genoma humano gracias a la movilización del elemento LINE-1[7].

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

El presente proyecto buscó determinar si ocurre inserción del ADN_k de *T. cruzi* I en el genoma de los pacientes con enfermedad de Chagas del área endémica de Santander (Colombia) a partir de muestras de sangre. Su finalidad es avanzar en la elucidación de las interacciones que ocurren a nivel molecular entre los genes de los pacientes humanos y los del parásito.

La posibilidad de la inserción de ADN del parásito en el genoma del huésped y la posterior identificación del sitio de inserción son fundamentales, por el posible papel que podrían jugar estos elementos en la patogénesis de la enfermedad o en su reactivación. Este hallazgo sólo ha sido reportado por el grupo de investigación de Brasil mencionado anteriormente y esto debe ser confirmado por otros grupos de investigación.

Metodología

Muestras disponibles

Las muestras de ADN analizadas forman parte de un estudio realizado por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) con individuos seropositivos a antígenos de *T. cruzi*. En la fase preliminar de este estudio, se estandarizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) S35/S36 en el laboratorio y se hicieron los correspondientes ensayos para descartar una posible interferencia con

Trypanosoma rangeli en el caso de las muestras que arrojaron resultados positivos en dicha PCR[8].

Las muestras fueron extraídas de sangre periférica de los pacientes seropositivos para antígenos de *T. cruzi*, mediante la extracción de ADN utilizando el protocolo denominado *salting out*. Para el presente proyecto, se incluyeron 130 muestras de pacientes sintomáticos con enfermedad de Chagas (con diferentes grados de cardiomiopatía) y 50 pacientes asintomáticos.

Amplificación del ADN de las muestras por reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizó PCR para determinar la presencia de ADN del parásito, con secuencias propias del mismo, más concretamente, con los pares de cebadores de secuencias específicas del ADN_k S35/S36 y ADN nuclear (ADN_n) Tcz1/Tcz2 de *T. cruzi*. Ambas PCR se realizaron de acuerdo con los parámetros de estandarización determinados en el laboratorio del grupo. Para cada PCR se utilizaron controles negativos y positivos. El corrimiento del producto de cada PCR se hizo en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio[9].

Doble digestión de ADN genómico con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI

Se utilizó ADN digerido con las enzimas de restricción EcoRI y

BamHI; este ADN luego se separó en un gel de agarosa al 0,7% y se transfirió a una membrana de nailon para hibridar posteriormente dichas muestras de la membrana con un oligonucleótido marcado enzimáticamente con digoxigenina.

Al realizar este procedimiento con el ADN del paciente (fragmentado en secuencias especificadas por las enzimas utilizadas en la digestión) y con una secuencia específica de un gen del parásito como sonda, es posible determinar si existen fragmentos de dicho gen del parásito insertado en el genoma de los pacientes.

La doble digestión se llevó a cabo preparando la correspondiente mezcla solución tampón con ambas enzimas y la muestra de ADN que se necesitaba digerir. Esta solución tampón es diseñada por el fabricante precisamente para garantizar un medio adecuado para cualquier par de enzimas endonucleasas durante una doble digestión de ADN genómico. Una vez preparada la mezcla, se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos.

Transferencia capilar de las muestras de ADN desde el gel de agarosa a una membrana de nailon

Una vez digeridas las muestras, se procedió a sembrarlas en un gel de agarosa al 0,7% y se corrió la

electroforesis a 55 voltios durante dos horas. Luego, se observó el gel en el transluminador y se tomó la correspondiente fotografía junto a una regla fluorescente.

A continuación, se preparó el gel para la transferencia, sumergiéndolo en una solución de desnaturalización (NaOH 0,5M, NaCl 1M) durante 30 minutos, con agitación mecánica a 60 rpm en una incubadora-agitadora (Heidolph UNIMAX 1010). Después se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una solución neutralizadora (NaCl 3M, Tris-HCl 1,5M, pH 7,5) nuevamente durante 30 minutos y con agitación mecánica a 60 rpm.

Una vez preparado el gel, se procedió a realizar el montaje de transferencia capilar siguiendo el protocolo correspondiente[10].

Marcación del oligonucleótido sintético kCR con digoxigenina, hibridación del mismo con las muestras de ADN de las membranas de nailon y detección de dicha hibridación mediante quimioluminiscencia

Se adquirió un oligonucleótido de 121 bp sintetizado por Corpogen, cuya secuencia es: 5'-TTT GGT TTT GGG AGG GGC GTT CAA ATT TTG GCC CGA AAA TTC ATG CAT CTC CCC CGT ACA TTA TTT GGC CGA AAA TGG GGG TTG TTC GAT GGA GGT

GAG GTT CGA TTG GGG TTG GTG TAA G. Esta secuencia, denominada kCR, es característica del ADN_k de los tripanosomátidos[11].

Para el proceso de marcación, hibridación y detección de este oligonucleótido, se dispuso del *DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II* (Roche). Para realizar esta parte del procedimiento, se siguieron las indicaciones planteadas en el manual del fabricante de dicho kit de reactivos[12].

Resultados

PCR de las muestras de pacientes con enfermedad de Chagas con los cebadores Tcz1/Tcz2

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

Cabe resaltar que se detectaron resultados positivos en muestras de ADN de pacientes con enfermedad de Chagas en la fase I, principalmente. Esto puede ser una señal de que, en las fases crónicas de la enfermedad,

Tabla 1. Resultados obtenidos con la PCR Tcz1/Tcz2

Fase de la enfermedad	Muestras (n)	Positivos (n)	Positivos (%)	Negativos (n)	Negativos (%)
I	50	4	8	46	92
II	21	1	4,76	20	95,2
III	82	0	0	82	100
IV	27	1	3,7	26	96,3

los parásitos están principalmente en los tejidos, mas no en la sangre[13].

PCR de las muestras de pacientes con enfermedad de Chagas con los cebadores S35/S36

Análogamente a lo descrito en el ítem anterior, en todas las PCR que se realizaron, se utilizó el ADN de una

cepa de *T. cruzi* como control positivo y una muestra sin ADN como control negativo, y se calcularon los pesos moleculares de las bandas de las muestras mediante el programa *Phot-CaptMW*.

En la figura 1 se muestra una foto de un gel de esta PCR. En esta fotografía se observa la banda de 330 bp en las muestras 04, 13, 14, 16, 23, 34,

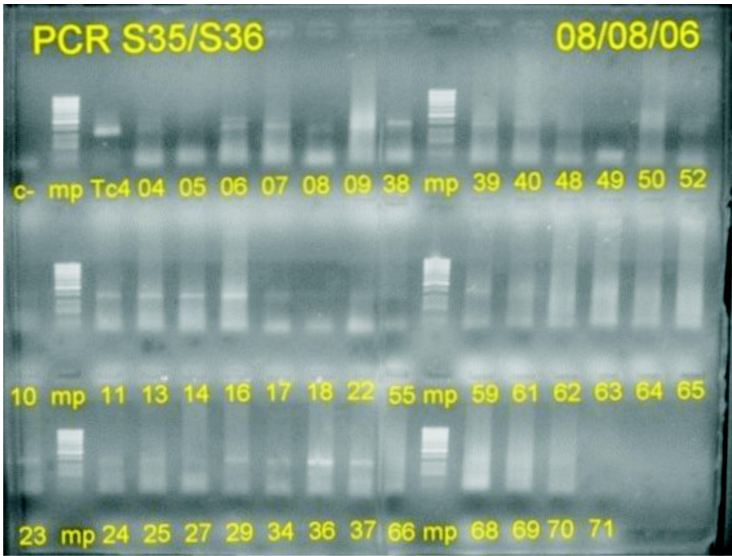


Figura 1. Fotografía del gel de agarosa con las muestras amplificadas por PCR con el par de iniciadores S35/S36.

37, 38, 39, 59, 63, 64, 68 y 69. Además, las muestras 06, 07, 08, 09, 10, 11, 17, 22, 24, 25, 27, 29, 36, 40, 48, 50 y 61 amplificaron una banda de 520 bp. Todas las muestras de esta fotografía corresponden a pacientes sintomáticos, es decir, personas que se encuentran en las fases II, III y IV de la enfermedad de Chagas. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos con la PCR S35/S36.

Doble digestión de ADN genómico con las enzimas de restricción BamHI Y EcoRI

Solamente se realizó esta doble digestión con las muestras positivas en la PCR con los cebadores S35 y S36 y que, además, tuvieran una concentración igual o mayor de 0,5 µg/µl, por lo cual se descartaron las muestras 89 y 237, correspondientes a pacientes asintomáticos, y las muestras 14, 16, 23, 39, 94, 113, 139, 140 y 142, correspondientes a pacientes sintomáticos. En este gel se utilizaron como controles positivos cinco muestras de

ADN de la cepa 338 de *T. cruzi* I amplificado por PCR S35/S36, las cuales están señaladas con flechitas rojas.

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

En los montajes de cada gel de agarosa se utilizó como control negativo una muestra de ADN de sangre periférica de una persona que no estuviera infectada con *T. cruzi*. Como controles positivos, se utilizaron un ADN genómico extraído de un cultivo de parásitos de *T. cruzi* I cepa 338, así como muestras de esta misma cepa amplificadas mediante la PCR con los cebadores S35 y S36.

La razón por la que se utilizó este amplificado es por lo reportado en el artículo de Nitz, Teixeira *et al.*, en el cual las bandas de la presunta inserción de ADN_k tienen tamaños de 100 bp y 400 bp, las cuales son más próximas al tamaño del amplificado (330 bp) que a la banda de 1.400 bp que

Tabla 2. Resultados obtenidos con la PCR S35/S36

Fase de la enfermedad	Muestras (n)	Positivos (n)	Positivos (%)	Negativos (n)	Negativos (%)
I	50	10	20	40	80
II	21	3	14,3	18	85,7
III	82	23	28	59	72
IV	27	8	29,6	19	70,4

hibrida en la muestra de ADN genómico del parásito[14].

No se observó hibridación de ninguna de las muestras de ADN de los pacientes con enfermedad de Chagas, ni sintomáticos ni asintomáticos, con la sonda DIG-kCR. La figura 2 muestra un ejemplo del resultado obtenido. En esta imagen se observa que sólo las cinco muestras de ADN amplificado de la cepa 338 de *T. cruzi* I hibridaron con la sonda DIG-kCR.

En la figura 3 se observa que todas las muestras presentes en esa membrana hibridaron con la sonda DIG-kCR, ya que dichas muestras corresponden a la cepa 338 de *T. cruzi* I.

La muestra denominada AM es un amplificado con PCR S35/S36; las muestras enumeradas con 1 y 3 hacen referencia a la cantidad de muestra de ADN genómico sembrado en el gel de agarosa (1 y 3 µl, respectivamente); las muestras 1d y 3d son estas mismas muestras sometidas a la doble digestión con las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI*.

Discusión

La PCR S35/S36 es notablemente más sensible que la PCR Tcz1/Tcz2, aunque menos específica, ya que detecta una secuencia que es común en todos los tripanosomátidos. Sin embargo, se observó que la mayoría de

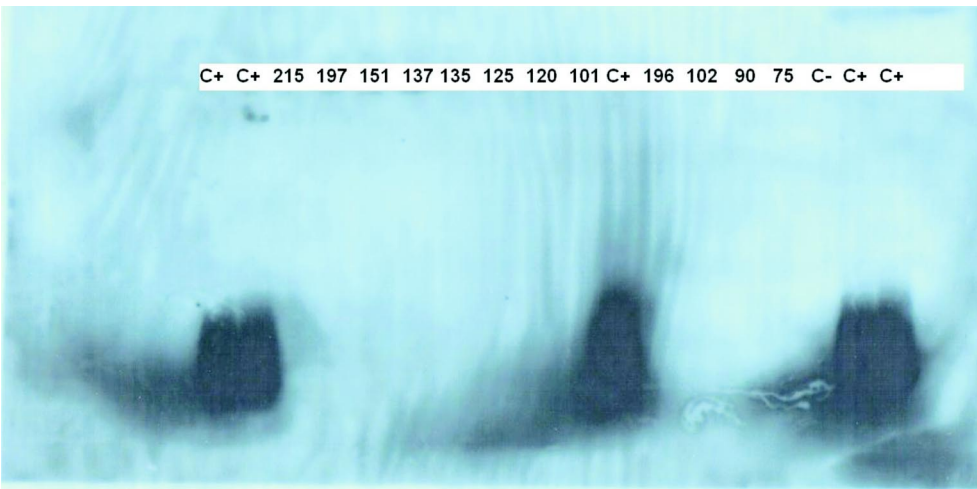


Figura 2. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana correspondiente al gel de agarosa de la figura 2.

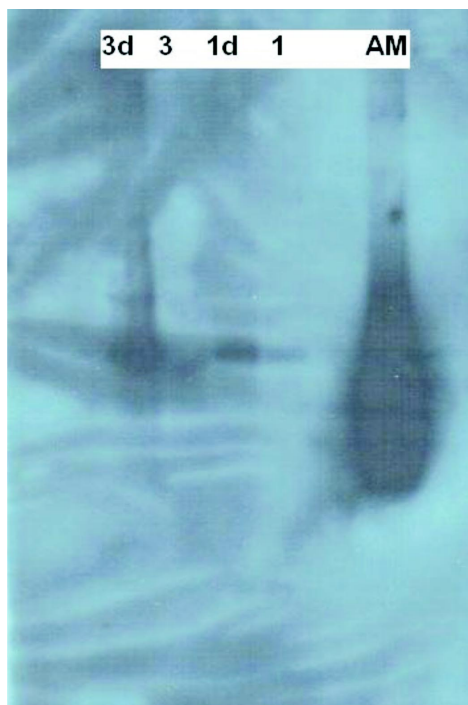


Figura 3. Imagen de la autorradiografía de hibridación en la membrana con muestras de ADN genómico del parásito, digerido y sin digerir.

las muestras de todas las fases de la enfermedad dan un resultado negativo. Además de eso, cabe resaltar la presencia de esa banda inespecífica de 520 bp; en vista de que dicha banda no se observó en las muestras de los controles positivos de ADN amplificado del parásito, se asume que fue inadvertidamente amplificada a partir de un segmento muy similar presente en el genoma humano[15].

Se observó la hibridación de la muestra de ADN del parásito amplifi-

cado por PCR S35/S36 (en el lado derecho de la figura 3).

Por otro lado, se obtuvo la misma banda de 1.400 bp que obtuvieron Nitz *et al.*, en la muestra de ADN genómico de la cepa 338 de *T. cruzi I* (señalada en la figura 3 con la flechita roja). Nótese que a diferencia del ADN_k purificado que utilizó Nitz, esta muestra contiene el ADN total del parásito, tanto nuclear como extranuclear (ADN_k), y a pesar de ello, se observó esta banda con una intensidad significativa, teniendo en cuenta que el ADN_k conforma sólo el 15% del ADN total del parásito.

Esto confirma la sensibilidad de esta técnica utilizando los reactivos del kit de Roche de marcación enzimática aleatoria con digoxigenina, ya que la hibridación utilizada por Nitz *et al.* se llevó a cabo con sondas marcadas radiactivamente. Se asume que la mayor intensidad observada en las muestras digeridas se debe a la mayor disponibilidad de estos fragmentos que se van a hibridar con la sonda DIG-kCR, puesto que sus análogos sin digerir se encuentran en un estado superenrollado que dificulta el acceso de la sonda para la correspondiente hibridación.

Esta ausencia de inserción del ADN_k del parásito en las muestras de los pacientes estudiados sugiere que el resultado de las PCR depende ex-

clusivamente de la cantidad de parásito presente en la sangre en el momento de la toma de dicha muestra. Por lo tanto, la hipótesis de inserción de ADN_k de *T. cruzi* en el genoma del paciente, como una posible forma de patogénesis de la enfermedad de Chagas, formulada por Teixeira *et al.*, puede descartarse en el caso de las muestras de ADN proveniente de sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Chagas de la zona endémica de Santander. Esta hipótesis había sido planteada en 1994 como una alternativa a las demás hipótesis existentes sobre la patogénesis de la enfermedad de Chagas, las cuales se agrupan en los dos frentes de discusión que han existido en torno a este tema: aquellas que se derivan de la teoría de la autoinmunidad y las otras derivadas de la teoría de la parasitemia[16].

Sin embargo, es importante señalar que este estudio sólo se pudo llevar a cabo con muestras de sangre periférica. Es necesario repetir este mismo procedimiento experimental con muestras de tejido cardíaco, lo que hasta el momento no se ha podido hacer debido a la dificultad para conseguir de dichas muestras.

Conclusiones

A partir de resultados de las PCR, se constató que el parásito está más presente en la sangre de los pacientes

que se encuentran en la primera fase de la enfermedad, es decir, en personas asintomáticas, ya que en los pacientes que se encuentran en fases más avanzadas de la enfermedad, el parásito se encuentra principalmente alojado en los tejidos afectados, concretamente en el tejido cardíaco. Con esto se explica por qué los resultados para las muestras provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas arrojan una cantidad menor de positivos a medida que va avanzando la enfermedad de Chagas.

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

El ADN_k de las cepas de *T. cruzi* I presentes en las muestras analizadas de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas de esta región, no se inserta en las células sanguíneas de los mismos. Esto significa que la hipótesis de la inserción del ADN_k del parásito en el genoma del paciente no sería la más adecuada para explicar la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo haría falta un análisis de mayor

cobertura de muestras para determinar si de verdad se debe descartar por completo esta hipótesis[16].

Se comprobó lo especialmente sensible que es la técnica de marcación enzimática aleatoria con digoxigenina, lo cual es uno de los resultados más satisfactorios de este estudio, puesto que permite realizar de manera completamente confiable este tipo de pruebas de marcación de sondas de ADN y de oligonucleótidos sin necesidad de utilizar elementos radioactivos, los cuales no sólo están por el momento por fuera del alcance del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, sino que también son intrínsecamente más delicados de manipular, almacenar y desechar.

También, se corroboró la especificidad de esta técnica, en vista de que sólo se obtuvo la hibridación correspondiente a la reportada por Nitz *et al.* en la muestra de ADN genómico del parásito[17].

Agradecimientos

El autor principal agradece profundamente al Grupo de Investigación en Bioquímica e Ingeniería de proteínas así como al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, por disponer del Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud para

la realización del presente estudio, y, por supuesto, a la Dirección de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por el apoyo financiero.

Consideraciones éticas

De acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, la presente investigación es clasificada sin riesgo, ya que no hace intervenciones a pacientes y, por lo tanto, no representa ningún riesgo biológico. Además, la información del paciente de quien se aisló el parásito no será utilizada y se mantendrá en reserva.

Bibliografía

1. Gaunt M, Yeo M, Frame I. Mechanism of genetic exchange in American Trypanosomes. *Nature*. 2003;421:936-9.
2. Junqueira A, Degraeve W, Brandao A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trend Parasitol*. 2005;21:270-3.
3. Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M and Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experim Parasitol*. 2006;114:279-88.
4. Baptista C, Vêncio R, Abdala S, Carranza J, Westenberger S, Silva M, *et al.* Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with

- clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol & Biochem Parasitol.* 2006;150:238-48.
5. Teixeira AR, Argañaraz ER, Freitas LH, Zulmira J, Lacava G, Santana J, *et al.* Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutat Research.* 1994;305:197-209.
 6. Nitz N, Gomes C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. *Cell.* 2004;118:175-86.
 7. Simoes-Barbosa A, Argañaraz E, Barros A, Nitz N, Teixeira A, Alves N, *et al.* Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:833-43.
 8. Zafra G, Flórez O, Morillo C, Martín J, González CI. Inmunogenética de la enfermedad de Chagas. *Salud UIS.* 2006;38:76-7.
 9. Ávila H, Pereira J, Thiemann O, De Paiva E, Degraive W, Morel C, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2421-6.
 10. Sanbrook RI. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Third edition. New York: CHSL Press; 2001. p. 110.
 11. Nitz N, Gomes C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. *Cell.* 2004;118:175-86.
 12. *Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization.* First edition. Manheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH; 2000;45.
 13. Tarleton R. Chagas disease: A role for autoimmunity? *Trend Parasitol.* 2003;19:447-51.
 14. Nitz N, Gomes C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. *Cell.* 2004;118:175-86.
 15. Gomes M, Macedo A, Vago A. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol.* 1998;88:28-33.
 16. Tarleton R. Chagas disease: A role for autoimmunity? *Trend Parasitol.* 2003;19:447-51.
 17. Nitz N, Gomes C. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome. *Cell.* 2004;118:175-86.