

## ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE LAS SECUENCIAS DE kDNA DE *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

Gustavo A. Vallejo<sup>1</sup>

### Resumen

En los países latinoamericanos en donde *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* se presentan en los mismos reservorios y son transmitidos al hombre por los mismos vectores, es de gran importancia el desarrollo de metodologías que permitan la caracterización y el diagnóstico diferencial de los dos parásitos. Las secuencias de kDNA o DNA del cinetoplasto se han utilizado para el diagnóstico y la caracterización de estos tripanosomátidos. Este particular DNA representa el genoma mitocondrial y constituye entre el 10 y el 20% del DNA total. Está conformado por una compleja red, que en cada célula contiene entre 5.000 y 10.000 minicírculos y 50 maxicírculos concatenados entre sí. Los maxicírculos son similares al DNA mitocondrial de los eucariotas superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la traducción de energía en la mitocondria. Todos los minicírculos presentan por lo menos una región conservada que varía entre 100 y 200 pb. En *T. cruzi* existen cuatro copias de la región conservada organizadas como repeticiones directas, localizadas a 90°. Sorpresivamente, *T. rangeli* es hasta ahora el único tripanosomátido en el cual se ha podido comprobar la existencia de minicírculos con una, dos y cuatro regiones conservadas en una misma cepa del parásito. Los iniciadores denominados S35 y S36 amplifican un fragmento de 330 pb derivado de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi*, y muestran una elevada sensibilidad que permite la detección de 0,015 fg, o 10 minicírculos del parásito, o un parásito en 20 mililitros de sangre, o la detección de *T. cruzi* en tejidos momificados. Estos iniciadores también reaccionan con los minicírculos de *T. rangeli*, permitiendo la amplificación de un fragmento de 760 pb derivado de minicírculos de 1600 pb con dos regiones conservadas y un conjunto heterogéneo de fragmentos desde 300 hasta 450 pb derivados de minicírculos de 1600 pb de cuatro regiones conservadas. El análisis en geles de acrilamida de los productos de amplificación de las dos especies de tripanosomas permite la identificación de infecciones puras o mixtas en los insectos vectores o en los hospederos vertebrados. Recientemente, se analizaron cepas de *T. rangeli* aisladas en el departamento del Tolima a partir de *Rhodnius* y *Didelphis marsupialis*, capturados en ciclos de transmisión silvestre, y *Rhodnius prolixus* domiciliado. Usando técnicas de hibridización y PCR, se observó que la secuencia del minicírculo KP1 estuvo presente en todas las cepas aisladas en el ciclo doméstico, pero ausente en las cepas aisladas en los ciclos silvestres. Estos hallazgos sugieren la existencia de dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes, localizados en la misma área geográfica. Los resultados mencionados confirman la utilidad de los minicírculos de kDNA para la detección del parásito por PCR, o cuando son utilizados como sondas, para la caracterización de los ciclos epidemiológicos de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

*Palabras claves:* *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, kDNA, diagnóstico molecular, PCR

### 1.1. *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en las Américas

Un conocido aspecto que complica el diagnóstico de la tripanosomiasis americana es que en Colombia, al igual que en otros países latinoamericanos, el hombre puede ser infectado por dos especies de tripanosomas: *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, y *Trypanosoma rangeli*, el cual es considerado como un parásito aparentemente no patógeno para el huésped vertebrado. Una característica epidemiológica importante de estos parásitos es que en varios países

de América Central y del Sur, están presentes en los mismos vertebrados y en los mismos vectores (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro y Gore-Saravia, 1992). La existencia de *T. cruzi* y *T. rangeli* en una misma área geográfica complica el diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas, pues los resultados del xenodiagnóstico y hemocultivo se dificultan porque algunas formas de las dos especies son indistinguibles cuando se examinan en fresco o en láminas coloreadas (Vallejo *et al.*, 1988). Por otro lado, la existencia de infecciones simultáneas de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Recibido: diciembre de 1997; aprobado para publicación: febrero de 1997

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima. A.A. 546, Ibagué, Tolima. E-mail: gvallejo@utolima.ut.edu.co

en los humanos (Guhl *et al.*, 1987; Hudson *et al.*, 1988) compromete la serología de la enfermedad de Chagas, como consecuencia de las reacciones cruzadas entre las dos especies de tripanosomas (Guhl y Marinkelle, 1982; Guhl, 1990). Por lo tanto, existe consenso entre los parasitólogos de que en las áreas en donde coexisten las dos especies de tripanosomas se pueden producir frecuentes errores en el diagnóstico. Consecuentemente, en los países en donde *T. cruzi* y *T. rangeli* están en los mismos reservorios y son transmitidos al hombre por los mismos vectores, es de gran importancia el desarrollo de metodologías que permitan la caracterización y el diagnóstico diferencial de las dos especies de parásitos.

## 1.2. El diagnóstico de la infección crónica de *Trypanosoma cruzi*

El diagnóstico de la infección crónica con *T. cruzi* usualmente se realiza por la demostración de anticuerpos séricos que se unen a los antígenos del parásito. Varias técnicas sensibles como IFI, ELISA y pruebas de dot-blot con antígenos recombinantes o proteínas purificadas han sido utilizadas para la demostración de estos anticuerpos (Ferreira, 1992; Guhl *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de la elevada sensibilidad y especificidad reportada para estas técnicas, varios investigadores han señalado que un problema constante con cada uno de los ensayos es la existencia de una pequeña pero significativa proporción de reacciones falsa-positivas (Araújo, 1992). Por otro lado, se ha observado que algunos pacientes chagásicos presentan resultado negativo al diagnóstico serológico, aun en pruebas de dot-blot usando varios antígenos recombinantes (Levin *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta que en la actualidad la transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea tiende a ser más frecuente que la transmisión vectorial, la existencia de posibles resultados serológicos falsos negativos deberá ser objeto de especial investigación por el potencial riesgo que esta situación representa. Es justamente en los casos falsos negativos en que la detección del parásito por métodos moleculares más sensibles adquiere especial relevancia. Por otro lado, la detección del parásito con las nuevas herramientas de diagnóstico molecular adquiere importancia en el estudio de infecciones en modelos animales vertebrados y vectores, en la determinación del inóculo mínimo para producir infección y podría ser importante en la detección de *T. cruzi* en material de necropsia o en tejidos de momias.

La búsqueda de marcadores de DNA nuclear o mitocondrial (kDNA) para la detección y

caracterización de *T. cruzi* comenzó hace menos de una década con el uso de sondas de DNA total, sondas de DNA repetitivo nuclear, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de regiones repetitivas nucleares, de genes del mini-exón, repeticiones de rRNA (ácido ribonucleico ribosomal) o de kDNA. Varias de estas estrategias también han sido utilizadas en la caracterización y detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* como puede observarse en la tabla 1.

Antes de la adopción de la tecnología del DNA, los métodos de mayor éxito para el diagnóstico y la caracterización de los tripanosomátidos y otros parásitos estaban basados en reacciones con anticuerpos policlonales, monoclonales y perfiles isoenzimáticos. No obstante, estos métodos, así como otros basados en la caracterización de antígenos, proteínas, lípidos o tipificación de RNA, están sujetos a variación fenotípica, pudiendo ser afectados cualitativa y cuantitativamente por regulación de la expresión génica. En consecuencia, durante las etapas del ciclo del parásito se pueden encontrar diferentes enzimas, lípidos, glicoproteínas y RNAs, además de antígenos estadio específicos (Barker, 1989).

La elección del DNA como objetivo para el diagnóstico y la caracterización del parásito ofrece ventajas significativas, pues todas las secuencias del DNA están presentes en las diferentes etapas del ciclo de vida, y todos los organismos contienen secuencias de DNA que pueden ser utilizadas para diferenciar individuos, cepas, especies o géneros. Otra ventaja de los sistemas basados en la detección de DNA es que, a diferencia de los métodos de detección inmunológica, son independientes de la inmunocompetencia del paciente o de la historia de infecciones previas. En el caso del diagnóstico por detección de anticuerpos, que pueden persistir como memoria inmunológica, por ejemplo, la distinción entre infecciones pasadas o recientes es más difícil. Aunque Teixeira *et al.* (1994) plantearon la posibilidad de la integración del kDNA de *T. cruzi* en el genoma de los tejidos del huésped, el DNA de un hemoparásito parece no persistir por mucho tiempo en la circulación sanguínea, en ausencia del organismo intacto. Por consiguiente, se cree que toda detección de DNA del hemoparásito en la sangre, indica una infección activa.

Frecuentemente, el DNA seleccionado para el diagnóstico del parásito es repetitivo, reiterado o DNA de copia múltiple con extensiva variación intrínseca de la secuencia. Existen dos razones principales para la escogencia de esas secuencias reiteradas. En primer lugar, es esencial tener un número grande de

**Tabla 1:** Métodos de biología molecular usados en la caracterización y detección de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*

Método	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Autores
Sondas de DNA total			Greig y Ashall, 1987; Ashall y Miles, 1988
Sonda nuclear de 195 pb	+	-	González <i>et al.</i> , 1984
Sonda nuclear de 1025 pb	+	-	Requena <i>et al.</i> , 1992
Sonda anónima nuclear de 1400 pb	-	+	Macedo <i>et al.</i> , 1993
Sondas de kDNA	+	-	Bosseno <i>et al.</i> , 1996; Brenière <i>et al.</i> , 1995 Macina <i>et al.</i> , 1987; Sánchez <i>et al.</i> , 1984 Solari <i>et al.</i> , 1991
Sondas de kDNA	-	+	Vallejo <i>et al.</i> , 1994
E.D. de kDNA total	+	-	Gonçalves <i>et al.</i> , 1991; Morel <i>et al.</i> , 1980 Solari <i>et al.</i> , 1992
E.D. de kDNA	-	+	Gonçalves <i>et al.</i> , 1991; Vallejo <i>et al.</i> , 1993
E.D. de kDNA amplificado por PCR	+	NR	Ávila <i>et al.</i> , 1990
I.D. con sonda multilocal 33.15	+	+	Macedo <i>et al.</i> , 1992; Macedo <i>et al.</i> , 1993
PCR del fragmento de 195 pb	+	-	Kirchhoff <i>et al.</i> , 1996; Moser <i>et al.</i> , 1989 Russomando <i>et al.</i> , 1996
PCR del fragmento 1025 de pb	+	-	Requena <i>et al.</i> , 1992
PCR del gene del mini-exón	+	+	Murthy <i>et al.</i> , 1992
PCR de espaciador intergénico ribosomal	+		Novak <i>et al.</i> , 1993
PCR región Intergénica ribosomal ITS3	+	+	Montaña, 1997
PCR de la repetición de 100 pb de rRNA	+	-	Souto y Zingales, 1993; Souto <i>et al.</i> , 1996
PCR de los minicírculos de kDNA	+	-	Ávila <i>et al.</i> , 1991, 1993; Bosseno <i>et al.</i> , 1996 Brenière <i>et al.</i> , 1995; Britto <i>et al.</i> , 1995 Stum <i>et al.</i> , 1989; Wincker <i>et al.</i> , 1994
PCR de los minicírculos de kDNA	+	+	Vallejo <i>et al.</i> , 1994, 1996, 1997a, 1997b, 1998
PCR de gen de proteína Tc24	+	-	Taibi <i>et al.</i> , 1995
PCR del gen de proteína flagelar	+	+	Silber <i>et al.</i> , 1997
AP-PCR y análisis de RAPDs	+	+	Souto <i>et al.</i> , 1996; Steindel <i>et al.</i> , 1993, 1994 Fernandes <i>et al.</i> , 1997
+ = El método fue usado en la caracterización o en la detección del parásito - = El método mostró resultados negativos con el parásito NR = El método no fue realizado con el parásito E.D. = Esquizodermos I.D. = Impresiones digitales de ADN nuclear AP-PCR = Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction RAPD = Randomly Amplified Polymorphic DNA			

copias de la secuencia como blanco para la hibridación o para la amplificación por PCR, pues el DNA de copia única es más difícil de ser detectado especialmente cuando la parasitemia es baja. Por otro lado, las secuencias repetitivas son con frecuencia menos conservadas, por no poseer función codificadora y, por lo tanto, su evolución origina variación entre especies o grupos (Barker, 1990).

Otro aspecto llamativo de la detección del DNA nuclear o el mitocondrial por métodos moleculares es su elevada sensibilidad, cuando se compara con los métodos convencionales de detección del parásito como el examen directo en la sangre, el hemocultivo o el xenodiagnóstico, etc. En la tabla 2 se resumen las sensibilidades de los diferentes métodos de biología molecular empleados para la detección de *T. cruzi*.

Durante los últimos 15 años las secuencias de kDNA han sido utilizadas para el diagnóstico y la caracterización de los tripanosomátidos. El DNA del cinetoplasto o kDNA está presente en el orden Kinetoplastida, que incluye los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Endotrypanum* y las formas de vida libre y parásitos de las familias Bodonidae, Cryptobiidae y Trypanophidae (Vickerman, 1976). Este DNA extranuclear forma una red compacta dentro de una compleja mitocondria. El DNA del cinetoplasto representa el genoma mitocondrial de estos parásitos y constituye entre el 10 y el 20% del DNA celular (Simpson, 1987; Stuart, 1983; Stuart y Feagin, 1992). La red está formada por concatenación de maxicírculos y minicírculos que pueden ser liberados de la red con topoisomerasa II

o enzimas de restricción (Borst *et al.*, 1987). La red de kDNA tiene entre 5.000 y 10.000 minicirculos cuyos tamaños varían de 0,5 Kb (*Trypanosoma vivax*) a 2,5 Kb (*Crithidia fasciculata*), y 25 a 50 copias de

los maxicirculos los cuales varían desde 19 Kb (*Bodo caudatus*) a 39 Kb (*Phytomonas davidii*) como puede observarse en la tabla 3.

**Tabla 2:** Sensibilidad de los diferentes métodos de biología molecular en la detección de *Trypanosoma cruzi*.

Método	Sensibilidad	Referencia
Sondas de DNA total		
Isotópicas (P <sup>32</sup> )	1000 fg <sup>a</sup>	Ashall <i>et al.</i> , 1988
Sondas de minicirculos		
no isotópicas (digoxigenina)	1000 fg <sup>b</sup>	Solarí <i>et al.</i> , 1991
PCR de la repetición de 195 pb y sonda isotópica (P <sup>32</sup> )	1 fg <sup>c</sup>	Moser <i>et al.</i> , 1989
PCR de la repetición de 1025 pb	10 fg <sup>b</sup>	Requena <i>et al.</i> , 1992
PCR del gene del mini-exón	400 fg <sup>b</sup>	Murthy <i>et al.</i> , 1992
PCR de la repetición de 100 pb de rARN	0,20 fg <sup>d</sup>	Souto y Zingales, 1993
PCR de la región conservada de los minicirculos de kDNA y uso de sonda isotópica (P <sup>32</sup> )	0,015 fg <sup>e</sup>	Sturm <i>et al.</i> , 1989
PCR del gen de la proteína flagelar F29	10 fg <sup>f</sup>	Silber <i>et al.</i> , 1997
<p><sup>a</sup> DNA total calculado a partir del contenido de DNA de un parásito equivalente a 200 fg (Kooy <i>et al.</i>, 1989)</p> <p><sup>b</sup> DNA total</p> <p><sup>c</sup> Equivalente a 1/200 del DNA de un parásito</p> <p><sup>d</sup> Equivalente a 0,1% del contenido del DNA de un parásito</p> <p><sup>e</sup> DNA equivalente a 10 minicirculos o a 0,075 fg del DNA total de un parásito</p> <p><sup>f</sup> Equivalente a 1/20 del DNA nuclear</p>		

**Tabla 3.** kDNA de diferentes especies de tripanosomátidos ordenadas de acuerdo con los tamaños de los minicirculos

Especies	Minicirculo (Kb)	Minicirculo (clases)	Maxicirculo (Kb)
<i>Crithidia fasciculata</i>	2,5	20	38
<i>Trypanosoma mega</i>	2,3	70	26
<i>Crithidia oncopelti</i>	1,8	-	25
<i>Trypanosoma rangeli</i> KP1	1,8	-	-
<i>Trypanosoma rangeli</i> KP2	1,6	-	-
<i>Phytomonas serpens</i>	1,5	-	-
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1,4	20	33
<i>Phytomonas davidii</i>	1,1	10	39
<i>Trypanosoma brucei</i>	1,0	300-400	22
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	1,0	1	14-24
<i>Trypanosoma evansi</i>	1,0	1	-
<i>Herpetomonas muscarum</i>	0,9	múltiples	32
<i>Leishmania tarentolae</i>	0,9	3	31
<i>Trypanosoma lewisi</i>	0,8	-	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	0,5	-	22
(Modificado a partir de Maslov <i>et al.</i> , 1984; Ponzi <i>et al.</i> , 1984; Borst <i>et al.</i> , 1985; Pestov <i>et al.</i> , 1990; Stuart y Feagin, 1992; Sá-Carvalho <i>et al.</i> , 1993; Reclinos <i>et al.</i> , 1994; Vallejo, 1994)			

## Maxicírculos

Los maxicírculos son similares al DNA mitocondrial de los eucariotas superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la traducción de energía en la mitocondria (Simpson, 1987). De acuerdo con Stuart y Feagin (1992), la presencia de grandes cantidades de minicírculos refleja la habilidad de estos organismos para revisar las secuencias de nucleótidos de los transcritos mitocondriales por un nuevo proceso denominado edición del RNA («RNA editing»), en el cual varios residuos de uracilo son insertados o eliminados en sitios específicos de la secuencia. Se desconoce el significado de la organización de la red, sin embargo esta organización debe garantizar la proximidad de los transcritos de los maxicírculos y minicírculos, los cuales parecen interactuar durante la edición del RNA. Adicionalmente, la organización en una red podría ser importante para la segregación del kDNA durante la división celular.

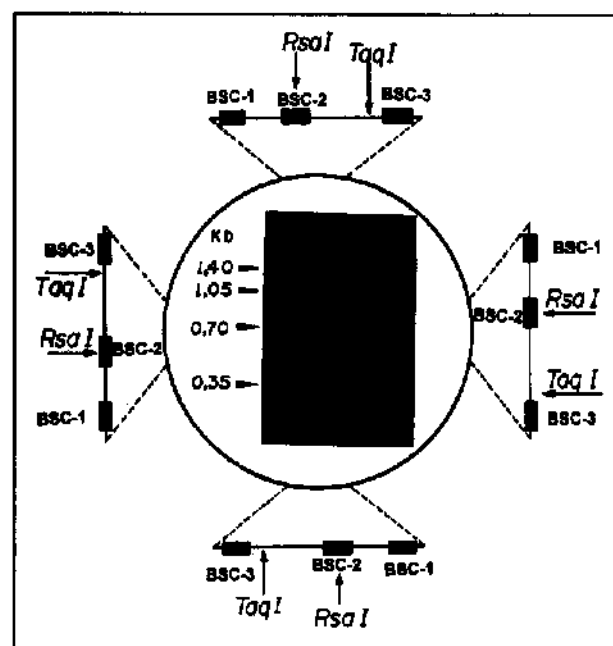
## Minicírculos

Los minicírculos linearizados se pueden observar fácilmente, cuando el DNA total o el kDNA de los tripanosomátidos es digerido con algunas enzimas de restricción. Por ejemplo, en relación con *T. cruzi* aparecen fragmentos de 1,4, 1,05, 0,70 y 0,35 Kb (fig. 1) y en *T. rangeli* la digestión del DNA total con *Hae* III permite visualizar las bandas correspondientes a 1,8 y 1,6 Kb (fig. 2).

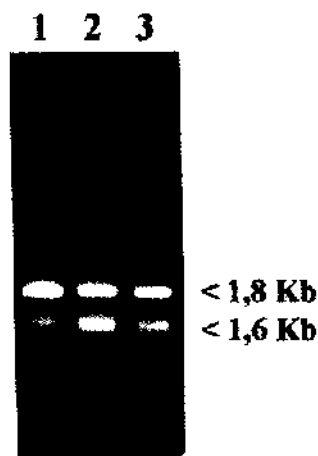
Todos los minicírculos presentan por lo menos una región conservada o "minirepeat" que varía entre 100 y 200 pb. Cada especie de tripanosomátido posee el mismo número de regiones conservadas (Myler, 1993). En *C. oncopelti*, *T. brucei* y *Leishmania tarentolae* se ha observado una sola región conservada (Pestov *et al.*, 1990; Jasmer y Stuart, 1986; Kidane *et al.*, 1984). En *C. fasciculata*, *T. lewisi* y *Phytomonas serpens* existen dos copias de la región conservada organizadas como repeticiones directas, localizadas a 180° una de la otra (Sugisaki y Ray, 1987; Ponzi *et al.*, 1984; Sá-Carvalho *et al.*, 1993). En *T. cruzi* existen cuatro copias de la región conservada organizadas como repeticiones directas, localizadas a 90°, como se puede ver en la figura 1 (González, 1986; Macina *et al.*, 1986; Degraeve *et al.*, 1988). Sorpresivamente, *T. rangeli* es hasta ahora el único tripanosomátido en el cual se ha podido comprobar la existencia de minicírculos con una, dos y cuatro regiones conservadas en una misma cepa del parásito (Recinos *et al.*, 1994; Vallejo *et al.*, 1994).

En todos los minicírculos secuenciados de las diferentes especies de tripanosomátidos, se ha

observado en la región conservada la existencia de tres bloques denominados "bloques de secuencia conservada" (BSC-1, BSC-2, BSC-3), los cuales son uniformes en sus secuencias, ordenamiento y distancia entre ellos (Ray, 1989; Sheline y Ray, 1989). Una secuencia de 12 nucleótidos (5'-GGGGTTGGTGTA-3'), denominada "secuencia universal" o bloque de secuencia conservada -3 (BSC-3), es la mayor secuencia conservada, y durante la replicación de los minicírculos se presenta como una región de cadena simple o "gap", y existe un pequeño RNA homólogo a esta región. Con base en estos datos se ha sugerido que la secuencia universal es el origen de replicación del minicírculo y que el RNA es el iniciador de la replicación (Stuart y Feagin, 1992). Tres modificaciones en la secuencia universal de minicírculos se han reportado: en *Crithidia oncopelti* 5'-aGGGTTGGTGTt-3' (Pestov *et al.*, 1990), en *P. serpens* 5'-GGGGTTGGTtATA-3' (Sá-Carvalho *et al.*, 1993) y en *T. rangeli* 5'-GGGGTTaGTGTA-3' (Recinos *et al.*, 1994; Vallejo *et al.*, 1994).



**Figura 1.** Representación esquemática de un minicírculo del kDNA de *Trypanosoma cruzi*, con cuatro regiones conservadas y cuatro regiones variables. En las regiones conservadas se representan los bloques de secuencia conservada (BSC-1, BSC-2 y BSC-3) y los sitios de restricción para las enzimas *RsaI* y *TaqI*. En la parte central del minicírculo se ha incluido un gel de agarosa con kDNA de cuatro clones de la cepa Y de *T. cruzi* digeridos con *BspRI*, un esquizoisómero de *Hae* III.



**Figura 2.** DNA total de las cepas H14 (Honduras), San Agustín y Choachí (Colombia) de *Trypanosoma rangeli* digerido con *Hae* III. Se observan dos tamaños de minicírculos de kDNA de 1,8 y 1,6 Kb

En la tabla 4 se comparan los bloques de secuencia conservada de *T. cruzi* con otras 16 especies de tripanosomátidos, y en la tabla 5 se muestran las distancias entre los bloques de secuencia conservada, medidas en número de pares de bases.

Los minicírculos de *T. cruzi* fueron secuenciados por tres grupos de investigación (González, 1984; Macina *et al.*, 1986; Degraeve *et al.*, 1988) y los minicírculos de *T. rangeli* fueron secuenciados por Recinos *et al.*, 1994, y Vallejo *et al.*, 1994. En la figura 3 se comparan 136 pares de bases correspondientes a las regiones conservadas de los minicírculos de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

La comparación de las regiones conservadas de los minicírculos entre *T. cruzi* y *T. rangeli* muestra una elevada homología en la secuencia, el orden y la distancia de los bloques de secuencia conservada (BSC-1, BSC-2, BSC-3). Es precisamente en estos bloques en donde es posible diseñar iniciadores para la detección mediante PCR de *T. cruzi* o de *T. rangeli*. Sobre los bloques de *T. cruzi* se diseñaron por lo menos tres parejas de iniciadores que han permitido la amplificación de fragmentos de 83 y 122 pb a partir de las regiones conservadas y 330 pb a partir de las regiones variables de los minicírculos (Sturm *et al.*, 1989) (fig. 4). Los iniciadores denominados S35 (5'-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y S36 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3') amplifican el fragmento de 330 pb (fig. 4), mostrando una elevada sensibilidad que permite la

detección de 0,015 fg o 10 minicírculos del parásito (Sturm *et al.*, 1989) o un parásito en 20 ml de sangre. Recientemente fueron utilizados estos mismos iniciadores para la detección de *T. cruzi* en tejidos momificados del norte de Chile (Guhl *et al.*, 1997).

Estos iniciadores también reaccionan con los minicírculos de *T. rangeli*, permitiendo la amplificación de un fragmento de 760 pb (fig. 5), derivado de minicírculos de 1600 pb con dos regiones conservadas y un conjunto heterogéneo de fragmentos desde 300 hasta 450 pb (fig. 5), derivados de minicírculos de 1600 pb de cuatro regiones conservadas (Macedo *et al.*, 1995; Vallejo *et al.*, 1996). El análisis en geles de acrilamida de los productos de amplificación de las dos especies de tripanosomas permite la identificación de infecciones puras o mixtas en los insectos vectores o en los hospederos vertebrados (Vallejo *et al.*, 1998).

En años recientes, Sheng-Yhi *et al.* (1992) describieron el fenómeno denominado transcinetoplastia, consistente en dramáticos cambios en las secuencias de los minicírculos de kDNA observados inicialmente en células de *Leishmania* durante la selección para resistencia a arsenito y tunicamicina. Este fenómeno involucra un rápido cambio en la proporción de secuencias de los minicírculos y ocurre sin pérdida de kDNA como sí sucede en la discinetoplastia, un fenómeno común en *T. equinum*, *T. evansi* y *T. equiperdum* en donde hay pérdida total o parcial del kDNA. Aunque el significado de la transcinetoplastia no está completamente aclarado, este fenómeno ofrece un nuevo modelo para el estudio de la evolución y perturbación de la función y la estructura de los genes mitocondriales en los tripanosomátidos.

Vallejo *et al.* (1994) clonaron y secuenciaron completamente dos clases de minicírculos de kDNA de *T. rangeli* denominados kP1 y kP2, los cuales presentaron diferencias en tamaño, organización y secuencia. Estudios de hibridización usando como sonda el minicírculo kP1 o iniciadores diseñados para amplificar regiones de kP1, mostraron que este minicírculo se encuentra presente en cepas de Honduras, Colombia y Venezuela, pero ausente en cepas del sur de Brasil, lo que sugiere la existencia de dos poblaciones de *T. rangeli* representadas por las cepas aisladas de la parte norte de suramérica y la región sur de Brasil. Esta divergencia genética entre los dos grupos mencionados fue corroborada a través de sondas multiloci y uniloci (Macedo *et al.*, 1993), estudios de isoenzimas y RAPDs (Steindel *et al.*, 1994) y estudios en las secuencias de los genes de mini-exón (Grisard y Romanha, 1997).

		BSC-1										BSC-2											
<b>CONSENSO</b>		atTccGAAAAATTTGGTTTTGGGAGGGCCGTTCAAcTTTtGGGgCgaAAATTCATGCATCTCCCCCGTAC																					
Y01-1	001	.A.T..GGCTGGA.....											A..G..CC.....A.....										070
Y01-2		T..GT.....C.G.....											A..G..CCG..A.....										
Y01-3		..AGCA...TCC.....											A..G..CCG..A.....										
Y01-4		...T.....TG.....											A..G..CC..A.....										
Y02-1		.A..A.G..GG.G.....											A..G..CC..A.....										
Y02-2		....G.T..T.A.A.....											A..G..CCG..A.....										
Y02-3		....TG...TC.GT.....											.....CG.....										
Y02-4		...TG.TT..G.CGT.....											.....CG.....										
CL1-1		T..CTG.GG..T.C.....											.....C.G.....										
CL1-2		....G.G..TG..G.T.....											.....G.....										
CL1-3		.A.T..GG...G...A.....	A.....										.....G.....										
CL1-4		.A.....G...T.C.....											.....G.....										
CL2-1		...T..G.....											.....C.G.....										
CL2-2		T..TG.GG..T..GT.....											.....G.....										
CL2-3		.A.A..G.G..AC.....											.....G.....										
CL2-4		.A.T..GG....C.T.A.....											.....G.....										
KP1		GA.....A.GCA.....	GA..AT..AT.GG...G..A.....																				
KP2-1		CG..A.....GT.....	GA..CA...GCC.....																				
KP2-2		TG..A.....GT.....	GA..ATA..TC.....																				
TRSA7-1		T.....TA.....	GA..G...TC...T.....																				
TRSA7-2		TACT.....G.....	GA..A.T.CC.....																				
TRSA2-1		T..GA...TTA..A.....	GA..G..ATCGGG.....																				
TRSA2-2		GA..A.....G.....	G..TCTC.GG.....																				
TRSA2-3		TC.GAA...TG..G.T.....	G..TCTC.GG.....																				
TRSA2-4		TC.GAA...TG..G.T.....	G..TCTC.GG.....																				
		<b>BSC-3</b>																					
<b>CONSENSO</b>		ATTATTTtGcccAAAAATggGgaTTTTTttaaGGGAGGTGG-GGTTTCGATTGGGGTTGGTGAATATAG																					
Y01-1	071	.....G.T.G.....-G..G...C.....											.....T										136
Y01-2		.....G.T.G.....-G..G...C.....											.....G.....										
Y01-3		.....G.T.G.....-G..G...C.....											.....G.....										
Y01-4		.....G..G.....G..G...C.....											.....G.....										
Y02-1		.....GGATTTTA...G..G...T.....											.....C.....										
Y02-2		.....GGATTTTA...G..G...C..T.....											.....G.....A.....										
Y02-3		.....GTG.....CCC..A...C.....											.....G.....										
Y02-4		.....CCG.....CTA.A...C.....											.....G.....A.....										
CL1-1		.....GGT.....	.....C.C.....										.....G.....										
CL1-2		.....G.....CCTA...C-G.....											.....G.....										
CL1-3		.....G.....CCTA...AC-G.....											.....C.....										
CL1-4		.....GG.TTT...AT...AC-G.....											.....G.....										
CL2-1		.....C.G.....ACTA...C-G.....											.....G.....										
CL2-2		.....A.....AC...CA-C.....											.....G.....										
CL2-3		.....G.....CTA...G.....											.....G.....										
CL2-4		.....G.....T.....CA-C.....											.....G.....										
KP1		.....G...A...CA.C...C.G.AA.CAG--A.....	A.....																				
KP2-1		.....TTCT..ATT...AA..C.AAA..AG..-A.....	A.....																				
KP2-2		.....TTCT..ATT...C.C...A...-A.....	A.....																				
TRSA7-1		.....TTCTCG...CT.AAA..C.A.A.T...-A.....	A.....																				
TRSA7-2		.....A.TATCTCA...TG...C.AAAT.AG..-A.....	A.....																				
TRSA2-1		.....CA.TAT...GTT.TG...C.....-A.....	A.....																				
TRSA2-2		.....CCTTG...T.T..TG...C.....-A.....	A.....																				
TRSA2-3		.....CCTTG...T.T..TG...C.....-A.....	A.....																				
TRSA2-4		.....CC.TA...TCAC-TG...C..A..T...-A.....	A.....																				

Figura 3. Alineación de 136 nucleótidos de las regiones conservadas de los minicírculos de kDNA de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Los bloques de secuencia conservada BSC-1, BSC-2 y BSC-3 se destacan con letras negras. En la columna de la izquierda aparecen las secuencias denominadas Y01-1, Y01-2, Y01-3, Y01-4 y Y02-1, Y02-2, Y02-3, Y02-4, las cuales corresponden a las cuatro regiones conservadas de dos minicírculos de la cepa Y de *T. cruzi*; así mismo, las secuencias CL1-1, CL1-2, CL1-3, CL1-4 y CL2-1, CL2-2, CL2-3, CL2-4 corresponden a las cuatro regiones conservadas de dos minicírculos de la cepa CL de *T. cruzi* (Degraeve *et al.*, 1988). KP1 corresponde a la región conservada de un minicírculo de 1,8 Kb de *T. rangeli* de la cepa H9 de Honduras; KP2-1 y KP2-2 corresponden a las regiones conservadas de un minicírculo de 1,6 Kb de *T. rangeli* de la misma cepa (Vallejo, 1994). TRSA7-1 y TRSA7-2 corresponden a las regiones conservadas de un minicírculo con dos regiones conservadas de la cepa San Agustín de Colombia, y TRSA2-1, TRSA2-2, TRSA2-3, TRSA2-4 corresponden a las regiones conservadas de un minicírculo de cuatro regiones conservadas de la misma cepa (Recinos *et al.*, 1994). Las secuencias fueron alineadas desde el nucleótido 001 hasta el 070 y desde el 071 hasta el 136, para maximizar su homología. Los puntos indican homología, las letras son sustituciones de las bases y los guilones son lagunas o "gaps". En los casos en que la homología es mayor del 60%, el nucleótido aparece con letra mayúscula en la secuencia consenso; en caso de que la homología observada fuese menor del 60%, el nucleótido aparece con letra minúscula. Las secuencias de *T. cruzi* se consultaron en el GenBank (números de acceso M18814, M18815, M18816, M19174, M19175, M19176, M19177, M19178, M19179, M19180, M19181, M19185, M19186, M19187, M19188, M19189, M19190, M19191 y M19192) y las secuencias de *T. rangeli* (números de acceso L19391, L19395, L28038 y L28039).

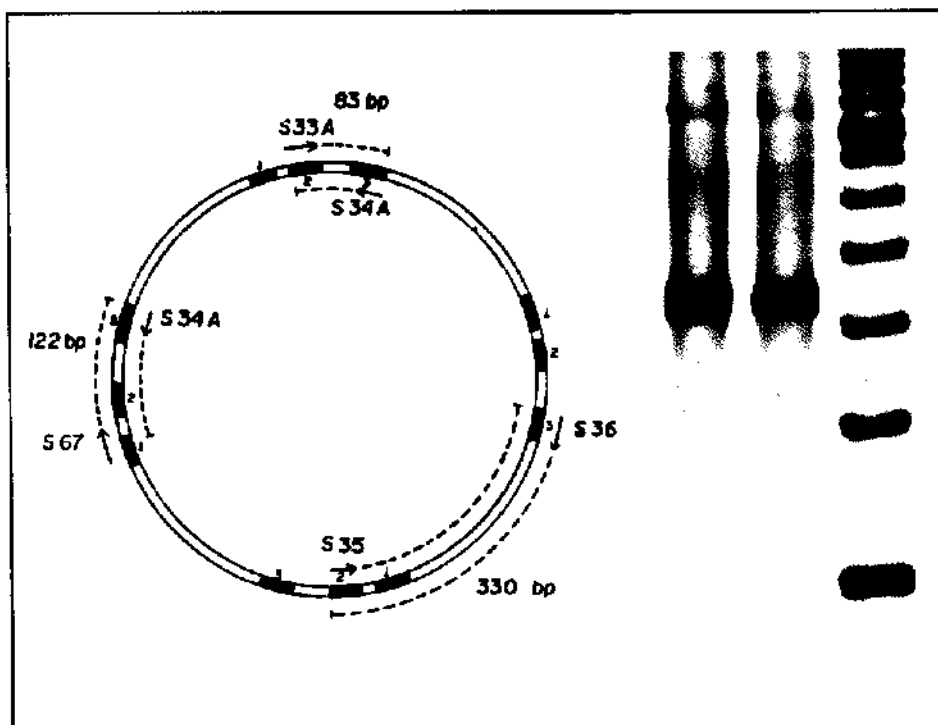


Figura 4. Representación esquemática de un minicírculo de *Trypanosoma cruzi* mostrando la organización de las cuatro regiones conservadas con los bloques de secuencia conservada (1, 2 y 3). Se indican los productos de amplificación de las regiones conservadas y de las regiones variables. Con los iniciadores S33A y S34A, se obtiene un producto de 83 pb a partir de las regiones constantes. Con los iniciadores S67 y S34A, se obtiene un producto de 122 pb originado de las regiones constantes. Con los iniciadores S35 y S36, se genera un producto de 330 pb a partir de las regiones variables. Cada pareja de iniciadores genera cuatro productos idénticos, pero, para simplificación del diseño, se indica un producto solamente (Modificado de Sturm *et al.*, 1989). En la parte derecha del diseño se presenta un gel de poliacrilamida al 6%, coloreado con nitrato de plata, mostrando los productos de amplificación de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* de dos cepas aisladas en Coyaima-Tolima. Se usó como marcador 100 pb ladder

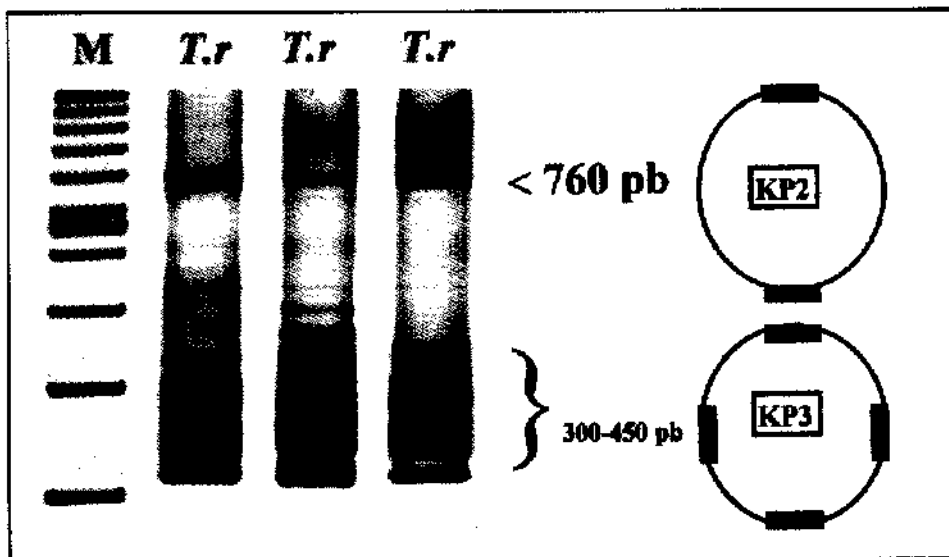


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 6% coloreado con nitrato de plata, mostrando los productos de amplificación de kDNA de tres cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas en Coyaima-Tolima. Con los iniciadores S35 y S36 se obtienen productos de 760 pb derivados de minicírculos con dos regiones conservadas (KP2) y un conjunto variable de 300 a 450 pb derivados de minicírculos con cuatro regiones conservadas (KP3)



Recientemente, Vallejo *et al.* (1997a, 19987b) analizaron cepas de *T. rangeli* aisladas en el departamento de Tolima a partir de *Rhodnius* y *Didelphis marsupialis*, capturados en ciclos de transmisión silvestre, y *Rhodnius prolixus* domiciliado. Por técnicas de hibridización y PCR, se observó que la secuencia del minicírculo KP1 estuvo presente en

todas las cepas aisladas en el ciclo doméstico, pero ausente en las cepas aisladas en los ciclos silvestres. Estos hallazgos sugieren la existencia de dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes, localizados en la misma área geográfica y probablemente similares a los grupos previamente descritos por Macedo *et al.* (1993) y Steindel *et al.* (1994).

**Tabla 4.** Bloques de secuencia conservada (BSC) de minicírculos de kDNA en diferentes especies de tripanosomátidos.

Organismo	BSC-1	BSC-2	BSC-3
<i>T. cruzi</i>	AGGGGCGTTC	CCCCGTAC	GGGGTTGGTGTA
<i>T. rangeli</i>	.....	.....	.....A.....
<i>C. fasciculata</i>	.....	T.....T.	.....
<i>C. oncopelti</i>	.....	T...C.TA	A.....T
<i>L. amazonensis</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. brasiliensis</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. donovani</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. guyanensis</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. infantum</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. panamensis</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. peruviana</i>	.....	.....T.	.....
<i>L. tarentolae</i>	.....	.....T.	.....
<i>P. serpens</i>	.T.....	T.....T.	.....A..
<i>T. brucei</i>	.T.....G.	T.....G.	.....
<i>T. congolense</i>	.A.....	TG.....	.....
<i>T. equiperdum</i>	.T.....G.	.A...G.	.....
<i>T. lewisi</i>	GA.....	C....AT	.....
<b>Consenso</b>	<b>AgGGGCGTTC</b>	<b>ccccgttc</b>	<b>ggggttggtgta</b>
Cada punto indica homología; las letras indican sustitución en las bases.			
(Adaptado de Ray 1989; Pestov <i>et al.</i> , 1990; De Bruijn y Barker, 1992; Majumder, 1992; Sá-Carvalho <i>et al.</i> , 1993; Lee <i>et al.</i> , 1993; Tripp <i>et al.</i> , 1994; Recinos <i>et al.</i> , 1994; Vallejo <i>et al.</i> , 1994)			

**Tabla 5.** Distancia entre los bloques de secuencia conservada en diferentes especies de tripanosomátidos

Organismo	BSC-1	D <sup>a</sup>	BSC-2	D <sup>b</sup>	BSC-3
<i>T. cruzi</i>		29		49	
<i>T. rangeli</i>		29		49	
<i>C. fasciculata</i>		28		45	
<i>C. oncopelti</i>		28		46	
<i>L. amazonensis</i>		30		48	
<i>L. brasiliensis</i>		29		47	
<i>L. donovani</i>		28		46	
<i>L. guyanensis</i>		29		47	
<i>L. infantum</i>		28		47	
<i>L. panamensis</i>		29		47	
<i>L. peruviana</i>		29		47	
<i>L. tarentolae</i>		27		47	
<i>P. serpens</i>		27		46	
<i>T. brucei</i>		20		41	
<i>T. congolense</i>		29		47	
<i>T. equiperdum</i>		21		38	
<i>T. lewisi</i>		29		47	
La distancia fue determinada como el número de pares de bases entre los bloques de secuencia conservada.					
D <sup>a</sup> : Distancia media entre BSC-1 y BSC-2 en pares de bases					
D <sup>b</sup> : Distancia media entre BSC-2 y BSC-3 en pares de bases					
(Adaptado de Ray 1989; Pestov <i>et al.</i> , 1990; De Bruijn y Baker 1992; Majumder, 1992; Sá-Carvalho <i>et al.</i> , 1993; Lee <i>et al.</i> , 1993; Tripp <i>et al.</i> , 1994; Recinos <i>et al.</i> , 1994; Vallejo, 1994)					

## CONCLUSIONES

De los métodos de biología molecular desarrollados en los últimos diez años, se ha señalado que la amplificación por PCR de los minicírculos de kDNA es la técnica de mayor sensibilidad para la detección de *T. cruzi* en la sangre de los hospederos vertebrados o en los vectores. La comparación de las secuencias de 136 pb correspondientes a las regiones conservadas de los minicírculos de kDNA de *T. cruzi* y *T. rangeli*, revela una inesperada homología en la secuencia, el orden y la distancia de los bloques de secuencia conservada (BSC-1, BSC-2, BSC-3). No es sorprendente que los iniciadores S35 y S36 diseñados sobre los bloques de secuencia conservada de *T. cruzi* y considerados originalmente como especie específicos, reaccionen también con los minicírculos de *T. rangeli* y amplifiquen por PCR una serie de fragmentos de tamaños variables que permiten la diferenciación de las dos especies de tripanosomas. Se ha mostrado una elevada sensibilidad del PCR para la detección de *T. cruzi* a partir de kDNA; sin embargo, los datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la sensibilidad para la detección de *T. rangeli* es menor. Por otro lado, en las infecciones mixtas existe una clara competencia de estos iniciadores para hibridar en los bloques de secuencia conservada de los minicírculos de *T. cruzi* o de *T. rangeli*, cuyo patrón de amplificación depende finalmente de la proporción relativa de los dos tripanosomas presentes en el vertebrado o en el intestino del vector. Actualmente, se adelantan investigaciones de campo para evaluar el uso y el comportamiento de estos iniciadores para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores y reservorios naturalmente infectados.

La transcinetoplastia conduce a cambios en la proporción de las secuencias de los minicírculos de kDNA como consecuencia de diversas presiones selectivas. En nuestro laboratorio, hemos detectado la secuencia de un minicírculo (KP1) de *T. rangeli* asociada exclusivamente a las cepas aisladas en los ciclos de transmisión doméstica. Aunque el significado de este fenómeno aún está por aclararse, la presencia de este marcador posibilita los estudios de la epidemiología molecular del parásito y ofrece un nuevo modelo para el estudio de la evolución y perturbación de la función y la estructura de los genes mitocondriales de los tripanosomátidos.

## AGRADECIMIENTOS

A Julio César Carranza Martínez, Nadia Castañeda, Jorge Lorenzo Sánchez Irreño y Julio César Silva, por su asistencia técnica en las reacciones de PCR

en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima. Al doctor Felipe Guhl Nannetti, del Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT) de la Universidad de los Andes, por la facilidad otorgada para utilizar algunas cepas de *T. rangeli*. Este trabajo fue financiado en parte con fondos del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (Colciencias), Proyecto 1105-04-181-95, y el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

## REFERENCIAS

- Araújo, F. G.** 1992. Serological diagnosis (Perspectives for confirmatory tests). *En: Wendel, S., Z. Brener, M. E. Camargo & A. Rassi, eds. Chagas' Disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.* ISBT Brazil'92. São Paulo, pp 219-223.
- Ashall, F. & M. A Miles.** 1988. Diagnosis of parasitic diseases using DNA-to-DNA hybridization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 235-236.
- Ávila, H. A., A. M. Gonçalves, N. S. Nehme, C. Morel & L. Simpson.** 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42:175-188.
- Ávila, H. A., D. S. Sigman, L. M. Cohen, R. C. Millikan & L. Simpson.** 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 211-222.
- Ávila, H. A., J. B. Pereira, O. Thiemann, E. de Paiva, W. Degraive, C. Morel & L. Simpson.** 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2421-2426.
- Barker, D. C.** 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99: S125-S146.
- Barker, R. H.** 1990. DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Exp. Parasitol.* 70: 494-499.
- Borst, P., F. Fase-Fowler, P. J. Weijers, J. D. Barry, L. Tetley & K. Vickerman.** 1985. Kinetoplast

DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15:129-142.

- Borst, P., F. Fase-Fowler & W. C. Gibson.** 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23:31-38.
- Bosseno, M. F., J. Telleria, F. Vargas, N. Yaksic, F. Noireau, A. Morin & S. F. Brenière.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: Study of a distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp. Parasitol.* 83: 275-282.
- Brenière, S. F., M. F. Bosseno, J. Telleria, R. Carrasco, F. Vargas, N. Yaksic & F. Noireau.** 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:179-184.
- Britto, C., M. A. Cardoso, C. M. Monteiro Vanni, A. Hasslocher-Moreno, S. S. Xavier, W. Oelemann, A. Santoro, C. Pirmez, C. Morel & P. Wincker.** 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110:241-247.
- D'Alessandro, A.** 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *En: Lumsden, W. H. R. & D. A. Evans, eds. Biology of Kinetoplastida.* V. I. London, New York and San Francisco, Academic Press, pp 327-493.
- D'Alessandro, A. & N. Gore-Saravia.** 1992. *Trypanosoma rangeli*. *En: Kreier, J. P. & J. R. Baker, eds. Parasitic Protozoa.* V. II. Academic Press, pp 1-54.
- De Bruijn, M. H. & D. C. Barker.** 1992. Diagnosis of new world leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of the kinetoplast DNA. Unpublished. GenBank Accessions M87314, M87315, M87316, M87317.
- Degrave, W., S. P. Fragoso, C. Britto, H. van Heuverswyn, G. Kidane, M. A. B. Cardoso, R. U. Mueller, L. Simpson & C. Morel.** 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:63-70.
- Fernandes, C. D., S. M. F. Murta, I. P. Cerávolo, L. P. Krug, P. G. Vidigal, M. Steindel, N. Nardi & A. J. Romanha.** 1997. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 92:343-351.
- Ferreira, A. W.** 1992. Tests for Chagas's Disease serodiagnosis: a review. *En: Wendel, S., Z. Brener, M. E. Camargo & A. Rassi, eds. Chagas' Disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.* ISBT Brazil '92. São Paulo, pp 179-193.
- Gonçalves, A. M., N. S. Nehme, N. Saravia, I. Segura & C. Morel.** 1991. Schizodeme analysis with de restriction endonuclease *Fsa* I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 86: 477-478.
- González, A., E. Prediger, M. E. Huecas, N. Nogueira & P. M. Lizardi.** 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3356-3360.
- González, A.** 1986. Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* minicircle. *Nucl. Acids. Res.* 14:9217.
- Greig, S. & F. Ashall.** 1987. Detection of South American trypanosomas in insects using total parasite DNA probes. *Parasitol. Today* 3: 375-376.
- Grisard, E. C. & A. J. Romanha.** 1997. Mini-exon gene variability among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from different geographic regions detected by low stringency single specific primer-PCR (LSSP-PCR). Proceedings of the XXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease (Caxambu, MG, November 11-14, 1997). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.* Vol 92, suppl. I, november 1997, p. 189.
- Guhl, F. & C. J. Marinkelle.** 1982. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76(3): 361.
- Guhl, F., L. Hudson, C. J. Marinkelle, C. A. Jaramillo & D. Bridge.** 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94: 475-484.
- Guhl, F.** 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 85:531-532.

- Guhl, F., M. García, R. Ching, O. Jullao, C. A. Jaramillo, D. Pachón y D. Barrios.** 1995. Enfermedad de Chagas transfusional en Colombia. *Trib. Med.* 91(3): 129-136.
- Guhl, F., C. A. Jaramillo, R. Yockteng, G. A. Vallejo & F. Cárdenas-Arroyo.** 1997. *Trypanosoma cruzi* in human mummies. *Lancet* 149 (9062):1370.
- Hudson, L., F. Guhl, N. de Sánchez, D. Bridge, C. A. Jaramillo & A. Young.** 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Parasitology* 96: 449-460.
- Jasmer, D. P. & K. Stuart.** 1986. Conservation of kinetoplast minicircle characteristics without nucleotide sequence conservation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8:257-269.
- Kidane, G., D. Hughes & L. Simpson.** 1984. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA in *Leishmania tarentolae*. *Gene* 27:265-277.
- Kirchhoff, L. V., J. R. Votava, D. E. Ochs & D. R. Moser.** 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1171-1175.
- Kooy, R. F., F. Ashall, M. van der Ploeg & J. P. Overdulve.** 1989. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:73-76.
- Lee, S. T., C. Tarn & K. P. Chang.** 1993. GenBank Accessions M94088, M94091.
- Levin, M. J., J. Franco de Silveira, A. C.C. Frasch, M. E. Camargo, S. Lafon, W. Degraeve & R. Rangel-Aldao.** 1991. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol. Immunol.* 89:11-19.
- Macedo, A. M., M. S. Martins, E. Chiari & S. D. J. Pena.** 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55:147-154.
- Macedo, A. M., G. A. Vallejo, E. Chiari & S. D. J. Pena.** 1993. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. En: Pena, S. D. J., R. Chakraborty, J. T. Epplen & A. J. Jeffreys, eds. *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag, pp 321-329.
- Macedo, A. M., G.A. Vallejo, E. Chiari, L. M. C. Galvão & S. D. J. Pena.** 1995. Hypervariable DNA markers in profiling genetic relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 90: 47-48.
- Macina, R. A., D. O. Sánchez, D. Gluschankof, O. Burrone & A. C. C. Frasch.** 1986. Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 25-32.
- Macina, R. A., S. Arauzo, M. B. Reyes, D. O. Sánchez, M. A. Basombrio, E. E. Montamat, A. Solari & A. C. C. Frasch.** 1987. *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 45-53.
- Majumder, H. K.** 1992. Unpublished. GenBank Accessions X68026 and X68027.
- Maslov, D. A., A. A. Kolesnikov & G. N. Zaitseva.** 1984. Conservative and divergent base sequence regions in the maxicircle kinetoplast DNA of several trypanosomatid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 12:351-364.
- Montaña, H. M. F.** 1997. La amplificación de tres marcadores moleculares, permite identificación y clasificación de *T. cruzi* así como su diferenciación con *T. rangeli*. Tesis B.Sc. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Santafé de Bogotá, 72 p.
- Morel, C., E. Chiari, D. M. Mattei, A. J. Romanha & L. Simpson.** 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplastic DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6810-6814.
- Moser, D. R., L. V. Kirchhoff & J. E. Donelson.** 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1477-1482.
- Murthy, V. K., K. M. Dibbern & D. A. Campbell.** 1992. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Cell. Probes* 6: 237-243.
- Myler, P. J.** 1993. Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop.* 53: 205-225.
- Novak, E. M., M. P. de Mello, H. B. M. Gomes, I. Galindo, P. Guevara, J. L. Ramírez & J. F. de Silveira.** 1993. Repetitive sequences in the ribosomal intergenic spacer of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 273-280.

- Pestov, D. G., L. A. Gladkaya, D. A. Maslov & A. A. Kolesnikov.** 1990. Characterization of kinetoplast minicircle DNA in the lower trypanosomatid *Crithidia oncopelti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 135-146.
- Ponzi, M., C. Birago & P. A. Battaglia.** 1984. Two identical symmetrical regions in the minicircle structure of *Trypanosoma lewisi* kinetoplast DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13: 111-119.
- Ray, D. S.** 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol. Cell. Biol.* 9:1365-1367.
- Recinos, R. F., L. V. Kirchhoff & J. E. Donelson.** 1994. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *T. rangeli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63: 59-67.
- Requena, J. M., A. Jiménez-Ruiz, M. Soto, M. C. López & C. Alonso.** 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 271-280.
- Russomando, G., A. Rojas de A., M. Almirón, A. Figueredo, M. E. Ferreira & K. Morita.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 83: 62-66.
- Sá-Carvalho, D., D. Pérez-Morga & Y. M. Traub-Cseko.** 1993. Characterization of kinetoplast DNA from *Phytomonas serpens*. *J. Euk. Microbiol.* 40: 317-322.
- Sánchez, D. O., R. Madrid, J. C. Engel & A. C. C. Frasch.** 1984. Rapid identification of *T. cruzi* isolates by «dot-spot» hybridization. *FEBS* 168: 139-142.
- Sheline, C. & D. S. Ray.** 1989. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 151-158.
- Sheng-Yhi, L., L. Shu-Tong & C. Kwang-Poo.** 1992. Transkinetoplastidy-A novel phenomenon involving bulk alterations of mitochondrion-kinetoplast DNA of a trypanosomatid protozoan. *J. Protozool.* 39(1):190-196.
- Silber, A. M., J. Bua, B. M. Porcel, E. L. Segura & A. M. Ruiz.** 1997. *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp. Parasitol.* 85: 225-232.
- Simpson, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: Genomic organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 363-382.
- Solari, A., J. Vanegas, E. González & C. Vásquez.** 1991. Detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by DNA hybridization with non-radioactive probes. *J. Protozool.* 38: 559-565.
- Solarl, A., S. Muñoz, J. Vanegas, A. Wallace, X. Aguilera, W. Apt, S. F. Brenière & M. Tibayrenc.** 1992. Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinian *T. cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp. Parasitol.* 75:187-195.
- Souto, R. P. & B. Zingales.** 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 45-52.
- Souto, R. P., O. Fernandes, A. M. Macedo, D. A. Campbell & B. Zingales.** 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141-152.
- Steindel, M., E. Dias Neto, C. L. P. Menezes, A. J. Romanha & A. J. G. Simpson.** 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *T. cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 71-80.
- Steindel, M., E. Dias Neto, C. J. Carvalho-Pinto, E. Grisard, C. Menezes, S. M. F. Murta, A. J. G. Simpson & A. J. Romanha.** 1994. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Euk. Microbiol.* 41: 261-267.
- Stuart, K.** 1983. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9: 93-104.
- Stuart, K. & J. E. Feagin.** 1992. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev. Cytol.* 141: 65-88.
- Sturm, N. R., W. Degraeve, C. Morel & L. Simpson.** 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 205-214.
- Sugisaki, H. & D. S. Ray.** 1987. DNA sequence of *Crithidia fasciculata* kinetoplast minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23: 253-263.
- Taibi, A., E. Guevara, A. Espinoza, R. Schöneck, B. Yahiaoui & A. Ouassi.** 1995. Improved

specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology* 111: 581-590.

**Telxela, A. R. L., E. R. Argarañaz, L. H. Freitas, Z. G. M. Lacava, J. M. Santana & H. Luna.** 1994. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutat. Res.* 305: 197-209.

**Tripp, C. A., P. J. Myler & K. Stuart.** 1994. Nucleotide sequence of a minicircle from *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 319-320.

**Vallejo, G. A., C. J. Marinkelle, F. Guhl & N. de Sánchez.** 1988. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Revista Brasil. Biol.* 48: 577-587.

**Vallejo, G. A., E. Chiari, A. M. Macedo & S. D. J. Pena.** 1993. A simple laboratory method for distinguishing between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 165-166.

**Vallejo, G. A.** 1994. *Trypanosoma rangeli*: Caracterização intra e interespecífica pela análise dos polimorfismos de DNA nuclear e kDNA. Tese Ph.D. Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil. 136 p.

**Vallejo, G. A., A. M. Macedo, E. Chiari & S. D. J. Pena.** 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 245-253.

**Vallejo, G. A., F. Guhl, E. Chiari, S. D. J. Pena & A. M. Macedo.** 1996. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase

Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Proceedings of the XXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease (Caxambu, November 6-8, 1996). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 91: 296.

**Vallejo, G. A., J. C. Silva, N. Castañeda, J. C. Jaramillo, J. C. Carranza, J. L. Sánchez & F. Guhl.** 1997a. Two major sub-populations of *Trypanosoma rangeli* in Colombia defined by sub-specific kDNA probes. Proceedings of the XXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease (Caxambu, November 11-14, 1997). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 92: 192.

**Vallejo, G. A., J. C. Carranza, J. L. Sánchez, J. C. Jaramillo & F. Guhl.** 1997b. Amplificación multiplex de kADN para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores y hospederos vertebrados. XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP). Instituto Pedro Kourí, La Habana-Cuba, 17 al 23 de noviembre de 1997. Resúmenes página 88.

**Vallejo, G. A., F. Guhl, E. Chiari & A. M. Macedo.** 1998. Specie-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Aceptado para publicación en *Acta Tropica*.

**Vickerman, K.** 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. En: Lumsden, W. H. R. & D. A. Evans, eds. *Biology of Kinetoplastida*. V.I. London, New York and San Francisco, Academic Press, pp 1-34.

**Wincker, P., C. Britto, J. B. Pereira, M. A. Cardoso, W. Oelemann & C. Morel.** 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 771-777.