

LA BIOLOGIA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

Dr. Gustavo Adolfo Vallejo, José César Jaramillo, Julio César Carranza, Jorge Lorenzo Sánchez, Leyder Helena Lozano, Diego Gualtero, Froylán Guayara, Ludwin Andrés Cuervo, María Teresa Mojica, Carlos Alberto Jaramillo y Académico Dr. Felipe Guh Correspondencia: Profesor Gustavo Adolfo Vallejo, Ph.D. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, A.A. 546 Ibagué, Colombia; Fax: (5782)644869; Tel: (5782)669176 E-mail: gvallejo@ibague.cetcol.net.co

Durante los últimos 35 años se ha experimentado un importante incremento de las publicaciones internacionales sobre la Tripanosomiasis Americana.

Una reciente búsqueda en la base de datos MEDLINE por internet utilizando las palabras claves "Trypanosoma cruzi", reveló 49 publicaciones en el quinquenio 1964-1968 con un incremento gradual hasta alcanzar la cifra de 1197 artículos internacionales en el quinquenio 1994-1998 (Figura 1). Sin embargo en cada uno de los países situados en las zonas endémicas de *T. cruzi*, existen numerosas publicaciones en revistas locales no indexadas cuya reseña queda excluida del MEDLINE. Sin embargo, el análisis de las publicaciones en el ámbito internacional permite identificar los paradigmas, los retos y los nuevos enfoques metodológicos que motivan y desafían a los diferentes grupos de investigación. Son numerosos los avances efectuados en estos últimos 35 años en área tan variadas como la biología celular, la inmunología, la inmunopatología, la bioquímica, la biología molecular y la quimioterapia de *T. cruzi*, así como también en estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas.

Los últimos 20 años se han caracterizado por un vigoroso auge de la investigación en bioquímica y biología molecular y el desarrollo de nuevas metodologías de genética molecular aplicadas exitosamente en los diferentes campos de estudio de la Tripanosomiasis americana. Se estima que más del 90% de los investigadores utilizan actualmente enfoques y herramientas moleculares en sus proyectos de investigación. El auge de la biología molecular en el caso particular de la parasitología o de la medicina tropical es la consecuencia de la aplicación de métodos refinados para estudiar regiones específicas del genoma de los organismos con los cuales los investigadores identifican la variabilidad genética de las poblaciones naturales del parásito y buscan

las posibles correlaciones con los ciclos epidemiológicos, con la sintomatología clínica, la potogenicidad, la susceptibilidad o resistencia al tratamiento.

El análisis de isoenzimas fue el primer abordaje de caracterización bioquímica de las cepas de *T. cruzi* llevado a cabo por Miles et al., 1977, 1978, 1980 que permitió identificar la existencia de tres zimodemos (Z1, Z2 y Z3).

Numerosos estudios realizados posteriormente, mostraron la correlación entre los zimodemos Z1 y Z3 con los ciclos de transmisión silvestre de *T. cruzi* y Z2 con los ciclos de transmisión doméstica. La mayoría de cepas de *T. cruzi* caracterizadas por isoenzimas en Colombia han sido aisladas de vectores y reservorios silvestres y algunas pocas de humanos. Varios trabajos realizados durante los últimos 15 años, revelan el predominio en nuestro territorio de los zimodemos Z1 y Z3 (Widmer et al., 1985; Ebert, 1985; Saravia et al., 1987; Triana, 1995; Márquez et al., 1997; Montilla, 1995; Montilla et al., 1997). Recientemente, Devia (1999), analizó 25 aislados humanos de *T. cruzi* de diferentes regiones geográficas encontrando 20 de ellos correspondientes al zimodemo Z1 y cinco al zimodemo Z3.

Finalizando la década del 70 surgieron los estudios del DNA del cinetoplasto (kDNA) utilizando endonucleasas para obtener perfiles de restricción denominados esquizodemos con los cuales fue posible determinar la variación intra e interespecífica de *T. cruzi* y su aplicación en los estudios epidemiológicos (Morel et al., 1980). Adicionalmente la heterogeneidad intraespecífica de *T. cruzi* fue también demostrada por análisis de cariotipos (Henriksson et al., 1993), análisis de impresiones digitales de DNA (Macedo et al., 1992) y análisis de RAPD (Steidel et al., 1993).

Desde finales de la década de los 80 hasta 1999, importantes avances se han efectuado en el área del diagnóstico y caracterización de *T. cruzi* utilizando técnicas moleculares entre las cuales se destacan el uso de antígenos recombinantes para el serodiagnóstico (Da Silveira, 1992) y la detección por amplificación del DNA del parásito utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta el momento se han propuesto al menos seis estrategias para la detección de *T. cruzi* por PCR, de las cuales la reacción basada en la amplificación de un fragmento de 330 pb originado de los minicírculos de kDNA es hasta el momento la técnica que ha mostrado mayor sensibilidad (Sturm et al., 1989, Avila et al., 1991; Britto et al., 1993). Esta técnica ha mostrado capacidad aún para detectar el DNA del parásito en restos momificados de esta 4.000 años de antigüedad (Guhl et al., 1999).

Adicionalmente a lo anterior, los iniciadores S35 y S36 cuando hibridizan con minicírculos de kDNA de *T. rangeli* generan el típico fragmento de 760 pb, derivados de minicírculos de kDNA con dos regiones conservadas y un conjunto de fragmentos heterogéneos cuyos tamaños varían desde 300 a 470 pb derivados de minicírculos con cuatro regiones conservadas (Vallejo et al., 1999a.)

Carranza et al., (1998), utilizaron 100 *Rhodnius silvestres* capturados en el departamento del Tolima y 150 *Rhodnius prolixus* en los departamentos de Cundinamarca y Santander para evaluar la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Cada insecto fue procesado para identificar los parásitos en láminas coloreadas con Guemsa y para extraer el DNA de las heces almacenadas en Guanidina-EDTA. Usando los primers S35 y S36, se obtuvieron los perfiles de amplificación de *T. cruzi* y/o *T. rangeli*. En el caso de los *Rhodnius silvestres*, los parásitos fueron detectados por observación microscópica directa en el 85% de las muestras y por PCR en el 94%. En el caso de los *Rhodnius prolixus* domiciliados, los parásitos fueron detectados en el 10,6% de las muestras por observación microscópica directa y por PCR fueron detectados en el 56,6%. El examen de 39 *Didelphis marsupialis* permitió la detección de *T. cruzi* en 31 individuos por hemocultivo y xenodiagnóstico y en 34 por PCR (Sánchez et al., 1998).

A pesar de la extensa variabilidad genética

detectada mediante análisis de isoenzimas de cientos de cepas y clones de *T. cruzi*, recientemente las poblaciones de este parásito han sido caracterizadas en dos linajes (linaje 1 y 2) sobre la base del dimorfismo observado en las secuencias del gen 24rRNA y del espaciador no transcrito del gen mini-exon (Souto y Zingales, 1993; Zingales et al., 1998). Esta última región es identificada iniciadores TC, TC1 y TC2 que amplifican 300 pb (*T. cruzi* linaje 1) o 350 pb (*T. cruzi* linaje 2) (Figura 3).

Con los trabajos de investigación adelantados durante los últimos tres años en diferentes países de Latinoamérica se demostró que el linaje 1 era equivalente al zimodemo 2 y el linaje 2 correspondía con el zimodemo 1. Para evitar confusión en esta nomenclatura un grupo de expertos reunidos en Rio de Janeiro en Abril de 1999, propuso su normatización.

ZIMODEMOS (Miles et al., 1977, 1978) LINAJES

(Souto et al., 1996) GRUPOS (Rio de Janeiro, 1999)

Z1 Linaje 2 *T. cruzi* 1

Z2 Linaje 1 *T. cruzi* 2

Z3

Tabla 1

Recomendaciones para la normatización de la nomenclatura de las cepas de *Trypanosoma cruzi* (Rio de Janeiro, Abril 11-16 de 1999)

La mayoría de las cepas de *T. cruzi* 2 ha sido aislado principalmente en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en los países del cono sur de América. En un grupo de 67 cepas aisladas en los estados de Amazonas, Paraíba, Piauí y Minas Gerais en Brasil, el 91% correspondieron a *T. cruzi* 2 y el 9% a *T. cruzi* 1 (Fernandes et al., 1998). *T. cruzi* 1 se ha asociado principalmente al ciclo de transmisión silvestre, pues este grupo fue detectado en 22 de 24 cepas

aisladas de *Didelphis marsupialis* en Rio de Janeiro (Fernandes et al., 1999), sin embargo, *T. cruzi* 2 fue detectado en la totalidad de 26 cepas aisladas del mono león dorado (*Leontopithecus rosalia*) y en 3 de 7 cepas aisladas de *Philander opossum* indicando que en los ciclos de transmisión silvestre de *T. cruzi* parece existir selectividad de las sub-poblaciones por hospederos específicos. Una situación similar también ha sido observada en las cepas aisladas de vectores, por ejemplo 4/4 cepas aisladas de *Rhodnius brethesi* en el amazonas brasilero correspondieron al grupo 1; 7/9 cepas aisladas de *Triatoma brasiliensis* en Piauí (Brasil), presentaron el tipo 2; 7/7 cepas de *Rhodnius prolixus* en Rio de Janeiro presentaron *T. cruzi* 1 (Fernandes et al., 1998,1999).

Los principales estudios realizados en Colombia utilizando estas mismas estrategias han arrojado los siguientes resultados: Builes et al., (1998) analizaron 36 cepas colombianas de *T. cruzi* aisladas de humano (1) *Didelphis marsupialis* (3), ratón silvestre (1), *Rhodnius prolixus* (7), *R. pallescens* (12), *Panstrongylus geniculatus* (7), *Eratyrus cuspidatus* (3) y *Triatoma dispar* (1), observando que la totalidad de las cepas amplificaron el perfil de *T. cruzi* 1 (Sánchez et al., 1998). La totalidad de 31 cepas aisladas por hemocultivo de *D. Marsupialis* del departamento del Tolima, correspondieron a *T. cruzi* 1 (Sánchez et al., 1998). Sin embargo, Montaña et al., (1998), reportaron la presencia de *T. cruzi* 2 en una cepa aislada de *Rhodnius prolixus* del departamento de Boyacá. Recientemente Devia (1999), demostró la presencia de *T. cruzi* 1 en 20 cepas aisladas de humanos en cinco departamentos de Colombia. Los resultados anteriores señalan que las cepas procedentes de reservorios, vectores y humanos aisladas por hemocultivo en nuestro país, corresponden en su inmensa mayoría a *T. cruzi* 1.

Una particular característica de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Colombia, Venezuela y los países centroamericanos, es que además de *T. cruzi*, los vectores y los vertebrados suelen estar infectados con *T. rangeli*, la segunda especie de tripanosoma que en América infecta al hombre y es considerado como no patógeno para el huésped vertebrado. Previos estudios mostraron una marcada divergencia genética entre cepas de *T. rangeli* de Colombia, Venezuela y Honduras cuando fueron comparadas con cepas aisladas en el sur de Brasil utilizando sondas de kDNA (Vallejo et al., 1994), impresiones digitales

de DNA (Macedo et al., 1993) y análisis de isoenzimas y RAPD (Steidel et al., 1994). Estudios recientes mediante hibridación con sondas de kDNA y PCR mostraron que en Colombia existen dos sub-poblaciones de *T. rangeli* denominadas KP1(+) y KP1(-) asociadas a los ciclos de transmisión doméstica y silvestre respectivamente (Vallejo et al., 1997a; 1997b, 1999b) (Figura 4). La divergencia genética entre estas sub-poblaciones fue observada mediante análisis de RAPD (Gualtero et al., 1998). (Figura 5).

A diferencia de los que ocurre en los países del cono sur (Brasil, Argentina y Chile, en países como Colombia, los insectos y vertebrados pueden albergar diferentes sub-poblaciones de *T. cruzi* y *T. rangeli* cuyas interacciones pueden ser determinantes en la clínica de la enfermedad de Chagas. Recientemente Carranza et al., (1999), examinaron 777 *Rhodnius prolixus*, 455 *Triatoma dimidiata* y 190 *Triatoma maculata* en viviendas rurales de Boyacá y Casanare y en el departamento del Tolima se capturaron 150 *Rhodnius* sp en palmas de vino (*Athalea butyraceae*). El contenido intestinal de los vectores con infección positiva fue analizado por PCR para estudiar la región intergénica del mini-exon con los iniciadores TC, TC1 y TC2. Para *T. rangeli* se amplificó una región de 165 pb derivada del minicírculo de kDNA de 1764 para discriminar dos grupos de *T. rangeli* denominados KP1(+) asociado a ciclos de transmisión doméstica y KP1(-) asociado a ciclos de transmisión silvestre. Los resultados aparecen en la tabla 2:

TRIATOMINO	<i>T. cruzi</i> 1	<i>T. cruzi</i> 2	<i>T. cruzi</i> 1+2	<i>T. rangeli</i> KP1(+)	<i>T. rangeli</i> KP1(-)
<i>R. prolixus</i>	29/73	6/73	12/73	25/73	1/73
<i>T. dimidiata</i>	38/39	0/39	0/39	1/39	0/39
<i>T. maculata</i>	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Rhodnius</i> sp	53/76	1/76	3/76	5/76	14/76

Tabla 2

Grupos de *T. cruzi* y *T. rangeli* en triatomíneos domiciliados y no domiciliados de Colombia

T. cruzi 1 y 2 presentaron prevalencias de 56% y 38% respectivamente en *R. prolixus* domiciliado, mientras que *T. cruzi* 1 fue el único grupo detectado en *T. dimidiata*. En los *Rhodnius* silvestres, *T. cruzi* 1 y 2 presentaron prevalencias de 74% y 5% respectivamente. Se detectó mayor frecuencia de *T. rangeli* KP1(+) en los vectores domiciliados y de *T. rangeli* KP1(-) en los vectores no domiciliados. También se observó superposición de los ciclos domésticos y silvestres de *T. rangeli*. La caracterización directa de los tripanosomas del contenido intestinal de vectores constituye un método sensible y rápido sin necesidad de cultivar el parásito *in vitro* con el subsecuente riesgo de selección de alguna de las sub-poblaciones presentes en el momento del estudio del parásito. La existencia de estas cuatro sub-poblaciones en los ciclos domésticos y silvestres de transmisión, podría tener importantes implicaciones en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Colombia. De lo anterior se concluye la necesidad de continuar los estudios sobre las interacciones de estas sub-poblaciones en los vectores y en los vertebrados, para contribuir al conocimiento de la Tripanosomiasis Americana en nuestro país.

Agradecimientos

La presente investigación fue financiada con fondos del Ministerio de Salud de Colombia, OMS/TDR, Instituto Colombiano Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS), European Community-Latin American Network for Research on the Biology and Control of Triatominae (ECLAT) y el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

Bibliografía

1. Ávila H A, Sigman, D S, Cohen L M, Millikan, R C, Simpson L. (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.

2. Britto C., Cardoso MA., Wincker P. and Morel C. (1993). A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in

blood samples and its use in Polymerase Chain Reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol 88:171-172.

3. Builes J.J., Mejía E., Moreno J. and Jaramillo N. (1998). Characterization of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* based on RAPD and dimorphism of both rRNA and mini-exon gene sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 39 (Suppl. 1):102

4. Carranza M.J.C., Sánchez I.J.L., Lozano L.E., Jaramillo J.C., Guhl F., Marinkelle C.J. y Vallejo G.A. (1998). "Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para el diagnóstico y caracterización de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en contenido intestinal de vectores naturalmente infectados en un área endémica del departamento del Tolima". XV Congreso Colombiano de Medicina Interna. *Acta Médica Colombiana.* 23(4): 239.

5. Carranza M.J.C., Vallejo G.A., Jaramillo J.C., Sánchez I.J.L., Lozano L.E., Cuervo L.A., Mojica M.T., Gualtero D., Pinto N., Molina J., Jaramillo C.A y Guhl F.(1999). Caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en vectores domiciliados y no domiciliados en Colombia. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Resúmenes página 3. Acapulco, Guerrero, México, Octubre 11-16 de 1999.

6. Da Silveira JF. (1992). *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. S. Wendel Z. Brener, M.E. Camargo, A. Rassi, Edts. ISBT Brazil 92, Sao Paulo, Brazil. pp:207-218.

7. Devia G.F.L. (1999). Caracterización bioquímica de cepas de *Trypanosoma cruzi* del departamento de Santander y otros departamentos. Tesis M.Sc. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. U. de los Andes. Santafé de Bogotá. 90 pp.

8. Ebert, F. (1985). Further isoenzymatic studies on *Trypanosoma cruzi* stocks from Brazil,

Colombia and Chile. *Trop. Med. Parasitol.* 36(2):85-87

9. Fernandes O., Souto RP., Castro JA., Pereira JB., Fernandes NC., Junqueira AC., Naiff RD., Barret TV., Degrave W., Zingales B., Campbell DA., Coura JR. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatominae classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(6):807-811

10. Fernandes O., Mangia RH., Lisboa CV., Pinho AP., Morel CM., Zingales B., Campbell DA., Jansen AM. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118(2):161-166

11. Gualtero D., Carranza J. C., Sánchez J. L., Silva J. C., Castañeda N., Jaramillo J. C., Guhl F. y Vallejo G. A. (1998). Divergencia genética entre poblaciones domésticas y silvestres de *Trypanosoma rangeli* en Colombia, confirmada mediante amplificación aleatoria de DNA (RAPDs). XXXIII Congreso Nacional de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Ibagué, octubre 14-17. Resúmenes: página 57.

12. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza, and Auderheide AC. (1999). Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108(4):401-407.

13. Henriksson J., Petterson U. and Solari A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Correlation between karyotype and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* 77:334-348

14. Macedo A M, Martins M S, Chiari E, Pena S D J (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasit.* 55: 147-154.

15. Macedo AM, Vallejo G A, Chiari E, Pena S D J (1993). DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and

Trypanosoma cruzi. In: Pena S D J, Chakraborty R, Epplen J T, Jeffreys A J, eds. *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag, pp 321-329.

16. Márquez EJ., Triana O., Moreno J., Naramillo N. (1997). Estructura clonal en poblaciones silvestres colombianas de *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica.* 17 (Supl.2):165-166.

17. Montaña MF., Jaramillo C. Y Guhl F. (1998). Diferenciación molecular de *Trypanosoma cruzi* y otros kinetoplastidos. Memorias del curso taller: Control de Tripanosomosis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Universidad de los Andes. Santafé de Bogotá, julio de 1998. pp:8-21

18. Montilla MM. (1995). Caracterización de las cepas de *Trypanosoma colombianas* por medio de isoenzimas y reacción en cadena de la polimerasa y su relación con el origen de aislamiento y procedencia geográfica. Tesis M.Sc. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Santafé de Bogotá.

19. Montilla MM., Guhl F., Nicholls RS and Breniere FB. (1997). Caracterización enzimática y por la reacción en cadena de la polimerasa de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica.* 17(Supl. 1):125-126.

20. Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 71:217-225.

21. Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature:* 819-821.

22. Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain

identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:221-237.

23. Morel C, Chiari E, Mattei D M, Romanha A J, Simpson L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplastic DNA minicircles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 6810-6814

24. Sánchez J.L., Carranza M.J.C. Gualtero D., Jaramillo J.C., Guhl F., Marinkelle C.J. y Vallejo G.A. (1998). Aplicación de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico y caracterización de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en reservorios naturalmente infectados en un área endémica del Departamento del Tolima. XV Congreso Colombiano de Medicina Interna. *Acta Médica Colombiana.* 23(4): 241.

25. Saravia NG., Hoguín AF., Cibulskis RE and 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(1):56-59.

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

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

28. Steindel M, Dias Neto E, Menezes C L P, Romanha A J, Simpson A J G (1993) Random amplified polymorphic DNA analysis of *T. cruzi* strains. *Mol. Bioch. Parasitol.* 60: 71-80.

29. Steindel M, Dias-Neto E, Carvalho-Pinto C J, Grisard E, Menezes C, Murta S M F, Simpson A J G. & Romanha A J (1994). Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* Strains. *J. Euk. Microbiol.* 41: 261-267.

30. Sturm N R, Degrave W, Morel C, Simpson L (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.

31. Triana O. (1996). Variabilidad genética en seis poblaciones de *Trypanosoma cruzi* y dos de *Trypanosoma rangeli*. Tesis M. Sc. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. Medellín. pp 61-65.

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

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

34. Vallejo G.A., Silva, J.C., Castañeda, N., Jaramillo, J.C., Carranza J.C., Sánchez, J.L., y Guhl F.(1997b). Two major sub-populations of *Trypanosoma rangeli* in Colombia defined by sub-specific kDNA probes. Proceedings of the XXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease (Caxambu, November 11-14, 1997). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.-November-1997. Page 192.

35. Vallejo G.A., Guhl F., Chiari E., and Macedo A.M. (1999a). Specie-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* 72(2): 203-212.

36. Vallejo GA, Carranza JC, Sánchez jl, Jamillo jc, Gualtero d. and Guhl F. (1999b). The identification by duplex PCR of two distinct strain-

group of *Trypanosoma rangeli* circulating independently in domestic and sylvatic cycles in Colombia. Sometido a publicación.

37. Widmer G., Marinkelle CJ and Guhl F. (1985). Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 79:253-257.

38. Zingales B., Souto RP., Mangia RH., Lisboa CV., Campbell DA., Coura JR., Jansen A. and Fernandes O. (1998). Molecular epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal of Parasitology.* 28:105-112.