



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“Asociación entre genotipos de clones de *Trypanosoma cruzi* y la distribución geográfica de los vectores capturados en Chile, mediante análisis de microsátélites.”

FELIPE DIAZ SOLER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: DR. JUAN VENEGAS HERMOSILLA

SANTIAGO, CHILE

2011

Financiado por FONDECYT
N° 1070837



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



Asociación entre genotipos de clones de *Trypanosoma cruzi* y la distribución geográfica de los vectores capturados en Chile, mediante análisis de microsátélites.

FELIPE DIAZ SOLER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA	: JUAN VENEGAS HERMOSILLA
PROFESOR CONSEJERO:	FERNANDO FREDES MARTINEZ
PROFESOR CONSEJERO:	PEDRO CATTAN AYALA

SANTIAGO, CHILE

2011

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi profesor guía, el doctor Juan Venegas, por su paciencia dedicación e interés durante la elaboración de mi memoria de título y a la doctora Gittith Sanchez por su apoyo y ayuda durante este proceso.

En segundo lugar a mi familia, especialmente a mis padres por su confianza y amor incondicional, a mis hermanos Carolina, Pablo, Ignacio y Benjamín por su inmenso cariño, a Martita y Alejandro por su enorme apoyo y cariño durante mi vida en Santiago y a Daniela y Sebastián, que se han transformado en mis hermanos y amigos.

En tercer lugar a mis amigos, fuente inagotable de energía, cariño y comprensión y a mis animales quienes solo me han dado su cariño incondicional, en especial la chiqui que ya no está conmigo.

Por último quiero agradecerle a Tamara, mi compañera, mi apoyo, mi amor, por su entrega, comprensión, dedicación e inmenso cariño durante el camino que hemos recorrido juntos.

INDICE

Capítulos	Página
Resumen	1
Summary	3
1. Introducción	4
2. Revisión bibliográfica	5
2.1. Distribución de la Enfermedad de Chagas	5
2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.3. Poblaciones de <i>T. cruzi</i>	7
2.4. Técnicas moleculares	9
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
3. materiales y métodos	11
3.1. Población de triatominos en estudio	11
3.2. Muestras de <i>T. cruzi</i>	11
3.3. Amplificación de microsatélites de <i>T. cruzi</i> en muestras procedentes de	11
Triatominos	
3.4. Detección de los productos de amplificación de los marcadores	12
microsatélites	
3.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida	12
3.4.2. Electroforesis capilar	12
3.5. Determinación del genotipo de los clones predominantes	12
3.6. Determinación del número mínimo de clones	13
3.7. Determinación de linajes de clones predominantes de <i>T. cruzi</i>	13
3.8. Estudios estadísticos	13
3.9. Bioseguridad	14
4. Resultados	15
5. Discusión	22
6. Conclusión	25
7. Bibliografía	26

INDICE

Tablas	Página
Tabla I. Frecuencia del número mínimo de clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> , detectados en muestras de triatomínicos de tres regiones de Chile: Atacama, Valparaíso y Metropolitana, mediante marcadores microsatélites	16
Tabla II. Comparación estadística de las frecuencias del número mínimo de clones (NMC) entre pares de poblaciones de <i>T. cruzi</i> , provenientes de las tres regiones estudiadas	17
Tabla III. Genotipos y alelos de <i>T. cruzi</i> detectados en muestras provenientes de triatomínicos <i>T. infestans</i> de tres regiones chilenas estudiadas, mediante tres marcadores microsatélites	18
Tabla IV. Comparación estadística de las frecuencias alélicas de los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01 entre pares de poblaciones de <i>T. cruzi</i> , provenientes de tres regiones chilenas estudiadas, utilizando la Prueba Exacta de G con el programa Genepop	19
Tabla V. Resultados de la comparación estadística de las frecuencias alélicas de los tres loci de microsatélites en pares de poblaciones de <i>T. cruzi</i> , provenientes de tres regiones chilenas estudiadas, utilizando el método exacto de Fisher	20
Tabla VI. Distribución y frecuencia de linajes de los clones predominantes de <i>T. cruzi</i> encontrados en triatomínicos capturados en tres regiones chilenas estudiadas, mediante análisis de microsatélites	21

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es causada por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insectos vectores pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae, género *Triatoma*. Se estima que en la actualidad hay aproximadamente quince millones de personas infectadas por *T. cruzi* en Latino América, incluido Chile. En nuestro país, la zona endémica se extiende desde la Región de Arica y Parinacota (XV) hasta la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (VI), siendo consideradas hiperendémicas las regiones de Atacama (III) y Coquimbo (IV). Vectores triatominos procedentes de las distintas regiones podrían ser portadores de diferentes clones de *T. cruzi* debido, posiblemente, a un proceso de selección de clones del parásito que triatominos de las distintas zonas geográficas podrían albergar. Este hecho favorecería la aparición de diferencias genéticas entre los clones, estructurándose así distintas poblaciones de *T. cruzi* en vectores de regiones diferentes. Actualmente, las poblaciones de *T. cruzi* se agrupan en seis unidades de tipificación discreta (DTUs) o linajes, denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, los cuales se podrían comportar de un modo distinto en el hospedero humano, como ya se ha sugerido respecto de su infectividad. Con el fin de aportar información al conocimiento de la estructura poblacional de *T. cruzi*, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar genótipicamente los clones del parásito presentes en el contenido intestinal de vectores *Triatoma infestans* provenientes de tres regiones endémicas de Chile. Se utilizaron métodos de genética de poblaciones y tres marcadores microsatélites para analizar 109 muestras de poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de 21, 62 y 26 triatominos, provenientes de las regiones de Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM), respectivamente. Estos triatominos fueron colectados por el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans*, llevado a cabo por el Ministerio de Salud de Chile durante el periodo 2005-2007. El 56,8% de las poblaciones de *T. cruzi* analizadas estaba compuesto por uno (33%) o dos clones (23,8%) y, estas últimas fueron mayoritarias entre las muestras multiclonales. Respecto del linaje, los más frecuentemente detectados fueron TcI y TcIII, en el total de muestras analizadas. Además, los resultados obtenidos en este estudio indicaron que las poblaciones de *T. cruzi* presentes en triatominos de las tres regiones de Chile eran genéticamente diferentes en base a sus frecuencias alélicas. Así, los resultados de este trabajo sugieren que el ciclo de transmisión de *T. cruzi* y el intercambio genético entre sus poblaciones se habría

limitado posiblemente por una disminución de su tamaño poblacional debido al Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliar de *T. infestans*.

SUMMARY

Chagas disease or American trypanosomiasis, is caused by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, transmitted by insects belonging to the order Hemiptera, family Reduviidae, genus *Triatoma*. It is estimated that there are now approximately fifteen million people infected with *T. cruzi* in Latin America, including Chile. In our country, the endemic area extends from Arica and Parinacota (XV) to Libertador General Bernardo O'Higgins (VI) Regions. Atacama (III) and Coquimbo (IV) are considered hyperendemic Regions. Triatomine vectors from the different regions could be carriers of different clones of *T. cruzi*, possibly due to a process of parasite clone selection that triatomines from different geographical areas could accommodate. This fact would favor the appearance of genetic differences between clones, structuring distinct populations of *T. cruzi* vector in different regions. Currently, populations of *T. cruzi* are grouped into six discrete typing units (DTUs) or lineages, known as TCI, TCII, TcIII, TCIV, TCV and TcVI, which they might behave differently in the human host, as it already has been suggested for its infectivity. To provide information to the knowledge of *T. cruzi* population structure, the aim of this study was to identify and characterize genotypically parasite clones present in the intestinal contents of vector *Triatoma infestans* from three endemic regions of Chile. By population genetics methods and three microsatellite markers 109 samples of populations of *T. cruzi* obtained from 21, 62 and 26 triatomines from the regions of Atacama (III), Valparaiso (V) and Metropolitan (RM), respectively were analyzed. These triatomines were collected by the Program for Eradication of house infestation of *T. infestans*, carried out by the Ministry of Health of Chile during the period 2005-2007. The 56.8% of analyzed *T. cruzi* populations was composed by one (33%) or two clones (23.8%) and these latter were the largest among the multiclonal samples. Regarding the lineage, the most frequently detected were TCI and TcIII in the analyzed samples. In addition, the results of this study indicated that populations of *T. cruzi* in triatomines present at the three regions of Chile were genetically different based on their allelic frequencies. Thus, the results of this study suggest that the transmission cycle of *T. cruzi* and genetic exchange among populations probably would have been limited by a decline in population size due to the Eradication Program house infestation of *T. infestans*.

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, parásito protozoario, es el agente causal de la Enfermedad de Chagas transmitida por insectos triatomínicos. La enfermedad se caracteriza por un curso clínico muy variable, describiéndose desde casos asintomáticos a estados crónicos de cardiomiopatías o patologías gastrointestinales. Esta enfermedad constituye uno de los problemas principales de salud pública en América Latina, estimándose la existencia de alrededor de quince millones de personas infectadas. Los vectores responsables de esta zoonosis están limitados a invertebrados del orden Hemiptera, dentro de los cuales se encuentran los insectos triatomínicos. Diversos estudios han comprobado la presencia de poblaciones multiclonales de *T. cruzi* en triatomínicos en los que se ha detectado dos o más linajes genéticamente diferentes del parásito. En Chile se han descrito sólo tres especies de triatomínicos, llamados comúnmente vinchucas. Una de ellas, *Triatoma infestans*, está diseminada en América del Sur y es de hábitos nocturnos, domiciliarios y peridomiciliarios. Las otras dos especies, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, son endémicas de Chile y se asocian a ambientes silvestres y peridomésticos. En la actualidad, sólo las dos primeras especies se consideran vectores de *T. cruzi*, aunque se ha reportado la presencia de *T. cruzi* en *M. gajardoi*. Sin embargo, por el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans* del Ministerio de Salud, iniciado en 1991, Chile está certificado como país libre de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en el territorio endémico desde 1999. Dada la importancia de aproximarse al conocimiento de la estructura poblacional de *T. cruzi*, el objetivo de este trabajo fue analizar la estructura poblacional de *T. cruzi* en Chile a partir de la identificación y caracterización genotípica de los clones presentes en el contenido intestinal de 109 triatomínicos colectados por el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans*, 21 en la región de Atacama (III), 62 en la región de Valparaíso (V) y 26 en la región Metropolitana (RM). Para lograr este objetivo, se utilizaron métodos de genética de poblaciones y los marcadores microsatélites SCLE10, SCLE11 y MCLE01, previamente descritos en la literatura.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribución de la Enfermedad de Chagas

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, continúa siendo la enfermedad de origen parasitario de mayor morbilidad y mortalidad en el continente Americano, a pesar de importantes avances en el control de la transmisión vectorial y transfusional de su agente etiológico, el protozoo *T. cruzi* (WHO, 2002). La principal vía de infección de este parásito es la transmisión a través de vectores, insectos hematófagos conocidos como triatominos, seguida por la infección transfusional y luego otras formas de infección menos frecuentes, como son la infección transplacentaria, por transplante de órganos, ingestión de comida contaminada o por accidentes ocurridos durante el trabajo de laboratorio con material infectado (Brener *et al.*, 2000).

La distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas se extiende desde la Latitud 42° norte (América del Norte) hasta la Latitud 43° sur (América del Sur). Se calcula que existen alrededor de quince millones de personas infectadas, produciéndose entre cuarenta y cinco mil y cincuenta mil muertes al año debidas, principalmente, a la cardiomiopatía chagásica crónica (Díaz y Claiborne, 2007; WHO, 2007).

En Chile, el área endemo-enzootica de esta parasitosis se distribuye en forma natural en sectores rurales y peri-urbanos desde la Región de Arica y Parinacota (XV) hasta la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (VI), siendo consideradas hiperendémicas las regiones de Atacama (III) y Coquimbo (IV) (Zulantay *et al.*, 2004). En la Enfermedad de Chagas se distinguen tres fases clínicas: aguda, indeterminada o latente, y crónica.

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (**Figura1**) es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una mitocondria en la cual está situado el kinetoplasto, un organelo especializado que contiene DNA constituido por unos veinticinco a cincuenta maxicírculos y cinco mil a veinte mil minicírculos (Macedo *et al.*, 2002). Este parásito posee un genoma

nuclear diploide y su reproducción es principalmente clonal, aunque la reproducción sexual no está completamente ausente (Oliveira *et al.*, 1998; Machado y Ayala, 2001; Westenberger *et al.*, 2005).

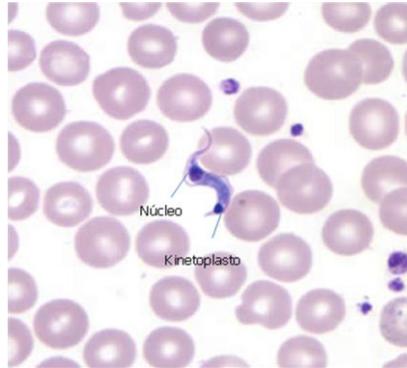


Figura 1

Frotis sanguíneo teñido con Giemsa. En el centro de la fotografía se observa el parásito protozoario *T. cruzi*, en el que se distinguen dos estructuras circulares correspondientes al núcleo y el kinetoplasto. (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm)

Trypanosoma cruzi puede hospedarse en varios mamíferos, entre ellos la especie humana, animales domésticos (caninos, felinos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos y conejos) y animales silvestres (roedores, primates, marsupiales y edentados) (Apt y Reyes, 1990; Wendell *et al.*, 1992). De esta manera, *T. cruzi* participa en los ciclos doméstico y silvestre de transmisión, como se ilustra en la **Figura 2**. En Chile, el vector que participa en el ciclo doméstico es *T. infestans*, mientras que en el ciclo silvestre es *M. spinolai* (Apt y Reyes, 1990; Apt *et al.*, 2008). Es interesante mencionar que hay evidencias de la presencia de *T. cruzi* en *M. gajardoi* (Botto-Mahan *et al.*, 2008), sin embargo esta especie aún no ha sido confirmada como vector (Apt *et al.*, 2008).

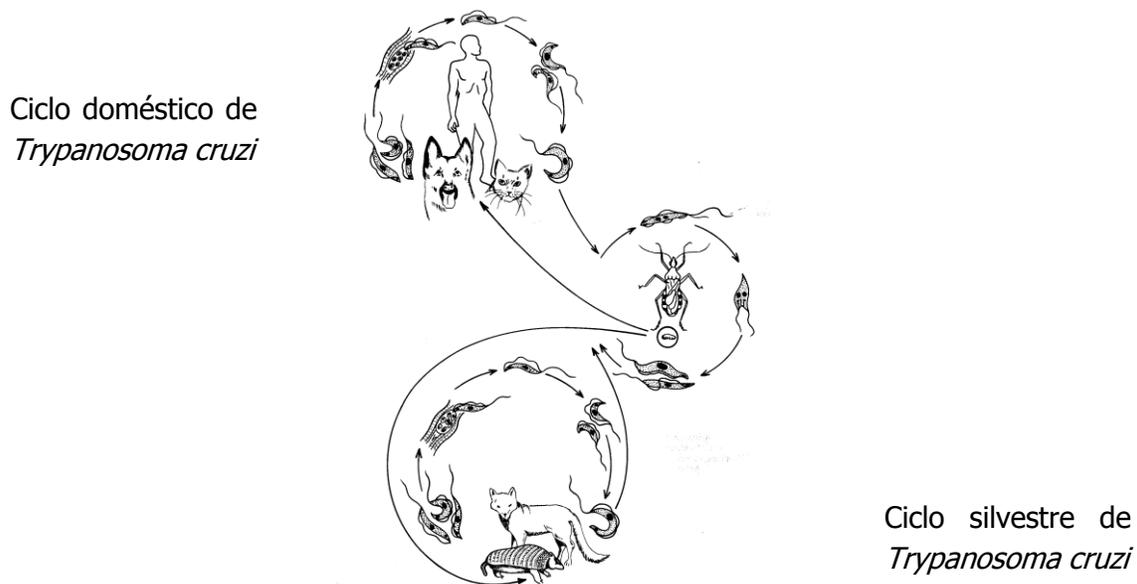


Figura 2
Ciclos de Transmisión de *Trypanosoma cruzi* (Atias y Neghme, 1992).

2.3 Poblaciones de *T. cruzi*

Inicialmente, las poblaciones de *T. cruzi* se habían agrupado en dos linajes o grupos principales denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, o “Discrete Typing Units” 1 y 2 (DTU1 y 2) (Brisse *et al.*, 2000; Barnabé *et al.*, 2005). A su vez, en el grupo DTU2 se habían diferenciado cinco subcategorías denominadas DTU2a, DTU2b, DTU2c, DTU2d y DTU2e, conformando de esta manera un total de seis grupos o linajes. El DTU1 correspondía al linaje TcI y los DTU2a a DTU2e, correspondían a los linajes TcIIa al TcIIe, respectivamente (Brisse *et al.*, 2000). Sin embargo, en el último consenso para unificar la nomenclatura sobre la filogenia de *T. cruzi*, se acordó denominar a los seis DTUs como: TcI (DTU1), TcII (DTU2b), TcIII (DTU2c), TcIV (DTU2a), TcV (DTU2d) y TcVI (DTU2e) (Zingales *et al.*, 2009). Los linajes TcV y TcVI corresponden a linajes híbridos (H) que se habrían originado, seguramente, producto de un evento de hibridación entre los linajes TcII y TcIII (Westenberg *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2006). Los parásitos que pertenecían al DTU1 se asociaron al ciclo de transmisión silvestre, a diferencia de los parásitos que pertenecían al DTU2 que se asociaron al ciclo de transmisión doméstico (Schofield, 2000).

Una vez que un triatomino libre de *T. cruzi* ingiere sangre de un mamífero infectado que contiene *T. cruzi* bajo la forma de tripomastigotes sanguíneos, el parásito protozoario infecta al insecto vector, ubicándose en el intestino del triatomino y utilizando el lumen intestinal como su ambiente de proliferación y diferenciación. Es en el lumen intestinal del insecto vector donde probablemente existen factores potenciales de selección que podrían amplificar o eliminar clones pertenecientes a determinados linajes del parásito. Un proceso de selección similar también podría ocurrir en los vertebrados mamíferos (Silveira *et al.*, 2000; Coronado *et al.*, 2006), en los cuales factores inmunitarios del hospedero podrían actuar como filtros selectivos diferenciales sobre clones de *T. cruzi* con distinta infectividad (Breniere *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1998). Al respecto, se ha reportado que algunos linajes encontrados en animales silvestres e insectos vectores, son incapaces de infectar a hospederos humanos (Breniere *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1998) mientras otros linajes de *T. cruzi*, como es el caso de TcVI, tendrían una baja prevalencia en mamíferos y probablemente se encontrarían mejor adaptados a hospederos invertebrados (Coronado *et al.*, 2006; Rozas *et al.*, 2007).

En cuanto a la estructura poblacional de *T. cruzi*, es probable que esta se encuentre influenciada por la procedencia geográfica del triatomino vector. Es sabido que diferentes áreas geográficas exhiben diferencias que se pueden evidenciar, en nuestro caso, tanto en la riqueza de especies de mamíferos presentes como en la distribución de los triatominos vectores que participan en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*. Esto también ocurre en las diferentes regiones de Chile, consideradas endémicas, cuyas características geográficas, hidrográficas y climáticas propias, influirían en la distribución de los tipos de vectores y de los tipos de parásitos encontrados en ellos (Xavier *et al.*, 2007). Por otra parte, tal como ha sugerido Pizarro *et al.* (2008), es importante considerar que las poblaciones de *T. infestans* poseen una baja capacidad de migración, característica que se ve acentuada por distancias y barreras geográficas que la impiden. Los diferentes factores recién mencionados contribuyen a que el flujo genético se encuentre restringido, tanto entre las poblaciones del vector *T. infestans* como entre las poblaciones intestinales de *T. cruzi* y, en consecuencia, se favorezca probablemente la aparición de diferencias genéticas entre los insectos vectores y entre los parásitos protozoarios (Hartl y Clark, 1997).

Aún en la actualidad, la distribución geográfica de las poblaciones de *T. cruzi* en América Latina no está totalmente clara. En Chile, distintos reportes, en su mayoría basados en

información obtenida a partir de aislados de laboratorio, discrepan en cuanto a las frecuencias de los linajes de *T. cruzi* detectadas en nuestro país. Lo mismo ocurre al revisar algunos datos publicados durante los últimos años, obtenidos a partir de muestras directas de triatomíneos y de pacientes chagásicos crónicos, los que también exhiben discrepancias en cuanto a la distribución de los linajes de *T. cruzi* (Coronado *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009; Venegas *et al.*, 2010).

Otro aspecto interesante de considerar, respecto de las poblaciones de *T. cruzi*, es que los pacientes chagásicos de áreas endémicas podrían estar infectados por múltiples contactos con diferentes triatomíneos y que éstos, a su vez, pueden alimentarse de distintos individuos infectados. Esta “promiscuidad” propiciaría la formación de poblaciones multiclonales de parásitos en los hospederos vectores, lo que explicaría el aislamiento, a partir de ellos, de cepas multiclonales de *T. cruzi*. Es así, que muchos estudios moleculares basados en zimodemas, esquizodemas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD), han revelado que los aislados de *T. cruzi* son principalmente multiclonales (Macedo *et al.*, 2002).

2.4 Técnicas moleculares.

Los estudios basados en marcadores genéticos han demostrado la gran variabilidad intraespecie de las poblaciones de *T. cruzi* (Goldstein y Pollock, 1997). Entre estos marcadores se encuentran los microsatélites, también conocidos como STR (“Short Tandem Repeats”, repeticiones cortas en tandem) o SSR (“Simple Sequence Repeats”, secuencias simples repetidas). Los microsatélites son secuencias repetitivas cortas, de uno a seis nucleótidos, de origen nuclear, originados como producto de errores que comete la DNA polimerasa durante la replicación del genoma (Gasche *et al.*, 2003). El alto grado de polimorfismo, su naturaleza codominante y su facilidad de detección por PCR, permite utilizar a los microsatélites como marcadores moleculares. Además, los microsatélites poseen una alta tasa de mutación haciendo que sean hipervariables entre individuos de una misma especie, o bien entre clones de una misma población. (Oliveira *et al.*, 1998).

El análisis de cepas de *T. cruzi* mediante microsatélites se ha utilizado para el estudio de la estructura poblacional del parásito, para la reconstrucción de relaciones filogenéticas y para definir la clonalidad de las cepas, es decir, para determinar si una muestra o aislado

de este parásito está compuesta de un solo clon (monoclonal) o está compuesta de dos o más clones (multiclonal) (Macedo *et al.*, 2001; Macedo *et al.*, 2004).

Dado el interés que encierra el conocimiento de la estructura genética poblacional de *T. cruzi*, y de sus proyecciones, en este estudio se propuso realizar un análisis genético comparativo de poblaciones del parásito procedentes de diferentes regiones geográficas de Chile, en base a la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS

En Chile, las poblaciones de *T. cruzi* presentes en *T. infestans* procedentes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, se diferencian en base a las frecuencias alélicas de marcadores microsatélites.

OBJETIVO GENERAL

-Identificar y caracterizar genotípicamente los clones de *T. cruzi* presentes en *T. infestans* de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, y determinar su estructura poblacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si los triatomíneos en estudio están infectados por uno (monoclonal) o varios clones (multiclonal) de *T. cruzi*, mediante análisis de marcadores microsatélites.
2. Determinar el genotipo de los clones predominantes de *T. cruzi* presentes en las tres poblaciones de triatomíneos en estudio, mediante el análisis de marcadores microsatélites.
3. Establecer si las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de triatomíneos de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, son genéticamente diferentes en base a las frecuencias alélicas de tres marcadores microsatélites.
4. Identificar linajes y determinar si existen diferencias significativas entre las frecuencias de ellos, en las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de triatomíneos de las tres regiones de Chile estudiadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población de triatominos en estudio

La población en estudio estuvo conformada por 109 triatominos positivos a *T. cruzi*, según la determinación realizada por PCR del kineoplasto, llevada a cabo por el Instituto de Salud Pública. Estos triatominos fueron obtenidos de tres regiones de Chile, de los cuales 21 procedían de la Región de Atacama, 62 de la Región de Valparaíso y 26 de la Región Metropolitana. Todos pertenecían a la colección del Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans*, realizado por el Ministerio de Salud durante el período 2005-2007.

3.2 Muestras de *T. cruzi*

Las muestras de *T. cruzi* fueron obtenidas a partir del contenido intestinal de cada triatomo, el que fue hervido y centrifugado para obtener los sobrenadantes que constituyeron las muestras a ser analizadas en este estudio, proceso que fue realizado por el Instituto de Salud Pública.

3.3 Amplificación de microsatélites de *T. cruzi* en muestras procedentes de triatominos

La técnica utilizada para la amplificación de los microsatélites de *T. cruzi* correspondió a una modificación del método descrito por Oliveira *et al.* (1998). El protocolo de amplificación fue el siguiente: Desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de amplificación consistentes en: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y 2 minutos a 72°C. Se realizó una extensión final de 10 minutos a 72° C, seguido por una segunda amplificación con una alícuota de 1 µl obtenida del primer PCR, en la cual únicamente se modificó el número de ciclos de amplificación, reducidos de 35 a 30, como la temperatura de hibridización, aumentada de 50 a 52°C, de acuerdo a condiciones establecidas previamente (Miranda, 2007).

Se utilizaron tres pares de partidores fluorescentes marcados con fluoróforos, para amplificar los marcadores microsátélites, correspondientes a SCLE10, SCLE11 y MCLE01.

3.4 Detección de los productos de amplificación de los marcadores microsátélites.

3.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Todas las muestras amplificadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, teñidos con bromuro de etidio, de acuerdo a condiciones establecidas previamente (Coñoepán, 2006). Las muestras que mostraron productos de amplificación en los geles de poliacrilamida, fueron enviadas para ser analizadas mediante electroforesis capilar al servicio de electroforesis capilar “Roy J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois”.

3.4.2 Electroforesis capilar

Para la detección de los distintos alelos de cada marcador, se realizó PCR utilizando partidores fluorescentes marcados con fluoróforos de distinto color. Para el análisis de los productos de amplificación fluorescentes, se compró el servicio de electroforesis capilar “Roy J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois”. Los gráficos resultantes del análisis (electroferogramas) fueron enviados por e-mail al laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, para ser estudiados. El número de pares de bases de cada alelo fue determinado utilizando alelos clonados de cada marcador como control. En este análisis, la mínima altura del peak detectable fue establecida en 80 unidades fluorescentes, en base a la publicación realizada por Venegas *et al.* (2009).

3.5 Determinación del genotipo de los clones predominantes

La determinación de los genotipos de los clones predominantes de *T. cruzi* en muestras que contenían múltiples alelos por locus, fue realizada por comparación de la intensidad de las unidades fluorescentes de los 2 “peaks” mayores, directamente en el

electroferograma. Cuando la tasa de intensidad entre el menor y el mayor peak fue menor que 1/3, se concluyó que el genotipo del clon predominante en esa muestra tenía un alelo (correspondiente al peak mayor) y entonces este era homocigoto. Por el contrario si la tasa de intensidad entre el menor y el mayor peak fue mayor que 1/3, se concluyó que el genotipo en esa muestra del clon predominante estaba formada por 2 alelos y entonces era heterocigoto (Venegas *et al.*, 2009). Además, para considerar que una muestra era heterocigoto, la diferencia entre el número de pares de bases entre dichos alelos no debía exceder los 32, 16 y 20 pares de bases para los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01, respectivamente (Venegas *et al.*, 2010).

3.6 Determinación del número mínimo de clones

El número mínimo de clones (NMC) de *T. cruzi* en cada muestra de triatomino fue estimada en base al marcador microsatélite que tuviera el mayor número de alelos y en base a la asignación del genotipo del clon predominante. De esta manera, la expresión de la operación matemática utilizada para obtener el NMC fue la siguiente: $NMC = \text{clon predominante} + \text{alelos adicionales}/2$. Si el resultado de la división “alelos adicionales/2” exhibía la fracción “0,5” se consideraba un clon adicional en el NMC (Venegas *et al.*, 2009). Por ejemplo, si el genotipo del clon predominante fuera homocigoto “100/100” y existieran los alelos adicionales “120”, “140” y “160”, entonces el número mínimo de clones quedaría expresado como $NMC = 100/100 + (120 + 140 + 160)/2$, lo que significa que el NMC sería el siguiente:

$NMC = 1 + (3)/2 = 3$. Si en cambio, el genotipo del clon predominante fuera heterocigoto “100/120” y los alelos adicionales fueran “140” y “160”, entonces el NMC obtenido sería: $NMC = 100/120 + (140 + 160)/2 = 2$.

3.7 Determinación de linajes de clones predominantes de *T. cruzi*

Para determinar el linaje en base al genotipo de clones predominantes y clones de *T. cruzi* de linaje conocido publicados en estudios anteriores (De Freitas *et al.*, 2006;

Venegas *et al.*, 2009), se utilizó el programa GeneClass con el método Bayesiano descrito por Rannala y Mountain (1997) y Piry *et al.* (2004). La asignación de linajes se realizó exclusivamente en aquellas muestras que presentaron un porcentaje de confiabilidad mayor o igual al 70%.

3.8 Estudios estadísticos

Para determinar si las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana presentan diferencias genéticas significativas, primero se realizaron estudios comparativos de la frecuencias alélicas de los clones predominantes de *T. cruzi* mediante el programa GenePop¹ (Raymont y Rousset, 1995a), utilizando el algoritmo de Markov y la prueba de probabilidad exacta de Fisher (Raymont y Rousset, 1995b). Luego, para determinar si las frecuencias de linajes y clonalidad de las poblaciones de *T. cruzi* encontradas entre las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana eran significativamente diferentes, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el programa computacional EzAnalyzer versión 2.5².

3.8 Bioseguridad

La manipulación de elementos que constituyen un riesgo químico, como el empleo de bromuro de etidio y geles de poliacrilamida, así como el manejo de sus desechos, se realizó según como se describe en el Manual de Normas de Bioseguridad elaborado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Anón, 2008).

¹ Genepop corresponde a un paquete de softwares de libre acceso, utilizado en estudios de genética de poblaciones.

² Complemento de Excel que permite realizar análisis estadísticos y es de obtención gratuita.

4. RESULTADOS

Objetivo 1: Determinar si los triatomínicos en estudio están infectados por uno o varios clones de *T. cruzi*, para luego establecer la distribución de la clonalidad (monoclonal o multiclonal) en las muestras de las tres regiones estudiadas.

En la **Tabla I** se puede observar que, del total de muestras analizadas, el 67% presentó dos o más clones de *T. cruzi* y el 33% restante correspondió a muestras monoclonales. En el conjunto de muestras multiclonales, se observó que predominaban las muestras con dos clones (35,6%), las cuales correspondían al 23,8% del total de muestras analizadas. El mayor número mínimo de clones (NMC), entre 3 y 9, se detectó en una cantidad cada vez menor de las muestras estudiadas, como se puede observar en la Tabla I. En consecuencia, los resultados presentados en la Tabla I exhiben un claro predominio de muestras compuestas de a lo más dos clones (56,8%), en las tres regiones. Al comparar las frecuencias de muestras monoclonales y multiclonales de triatomínicos infectados provenientes de las tres regiones en estudio, se observó que las diferencias encontradas entre las regiones de Valparaíso y Metropolitana fueron significativas, obteniendo un valor de p igual a 0,028 (**Tabla II**).

Tabla I. Frecuencia del número mínimo de clones de *Trypanosoma cruzi*, detectados en muestras de triatomíneos de tres regiones de Chile: Atacama, Valparaíso y Metropolitana, mediante marcadores microsatélites.

Número mínimo de clones de <i>T. cruzi</i> (NMC)	Número y porcentaje de triatomíneos			Total
	Atacama (n=21)	Valparaíso (n=62)	Metropolitana (n=26)	(n=109)
1	4 (19)*	26 (41,9)	6 (23,1)	36 (33)
2	6 (28,6)	15 (24,2)	5 (19,2)	26 (23,8)
3	2 (9,5)	10 (16,1)	3 (11,5)	15 (13,8)
4	3 (14,3)	3 (4,8)	2 (7,7)	8 (7,3)
5	3 (14,3)	2 (3,2)	7 (26,9)	12 (11)
6	2 (9,5)	2 (3,2)	1 (3,8)	5 (4,6)
7	1 (4,8)	1 (1,6)	1 (3,8)	3 (2,8)
8	0	3 (4,8)	0	3 (2,8)
9	0	0	1 (3,8)	1 (0,9)

*Entre paréntesis aparece el porcentaje de cada frecuencia respecto del total de muestras de la región correspondiente.

Tabla II. Comparación estadística de las frecuencias del número mínimo de clones (NMC) entre pares de poblaciones de *T. cruzi*, provenientes de las tres regiones estudiadas.

Par de población comparada	Diferencia de las Medias	Valor de T	Valor de p
V-RM	1,026	2,229	0,028
V-III	0,803	1,683	0,096
RM-III	0,223	0,376	0,708

El análisis fue realizado mediante el programa computacional EzAnalyzer versión 2.5, utilizando pruebas Post Hoc. Para este análisis se considerará el NMC de *T. cruzi* de cada muestra de triatmino encontrada en la Región de Valparaíso (V), Metropolitana (RM) y Atacama (III).

Objetivo 2: Determinar el genotipo de los clones presentes en muestras directas de contenido intestinal de triatomino provenientes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, mediante el análisis de microsatélites.

De las 109 muestras analizadas, en la **Tabla III** se presenta un ejemplo de la distribución de alelos y genotipos de *T. cruzi* para tres marcadores microsatélites, resultados del análisis de nueve muestras de triatomino, tres provenientes de cada región en estudio. Esta tabla quedó conformada por cinco columnas que contienen la siguiente información: número de muestra de *T. cruzi*, especie de triatmino, región de origen, loci SCLE10, SCLE11 y MCLE01. A modo de ejemplo, en el análisis de la muestra número 9 de *T. cruzi*, obtenida de *T. infestans* procedente de la Región de Atacama, se detectó una población multiclonal, donde el genotipo del clon predominante quedó conformado por los alelos destacados en negrita 255/255, 115/115, 178/178, según lo detectado con los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01, respectivamente.

Tabla III. Genotipos y alelos de *T. cruzi* detectados en muestras provenientes de triatomino *T. infestans* de tres regiones chilenas estudiadas, mediante tres marcadores microsatélites.

N° muestra de <i>T. cruzi</i> /Especie de triatomino/Región de origen			Genotipos y alelos detectados con el correspondiente marcador microsatélite		
Muestra	Especie	Región	SCLE10	SCLE11	MCLE01
9	<i>Ti</i>	III	255/255*	115/115	178/178
			217		
			237		
5	<i>Ti</i>	III	225/225	0	0
10	<i>Ti</i>	III	269/269	145/145	0
			257		
61	<i>Ti</i>	V	0	0	94/94
11	<i>Ti</i>	V	0	125/125	130/132
				109	106
				111	134
					136
52	<i>Ti</i>	V	0	ND	98/98
67	<i>Ti</i>	RM	251/253	0	ND
68	<i>Ti</i>	RM	207/207	175/175	ND
69	<i>Ti</i>	RM	259/259	135/139	ND
				129	
				149	

*Resaltados con negrita se muestran los genotipos de los clones predominantes, presentes en muestras de *T. infestans* (*Ti*) encontrados en la Región de Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM). Los valores que no están resaltados con negrita corresponden a alelos de los clones minoritarios, alelos que no pudieron ser determinados (ND) o aquellos donde no se obtuvo valores en el electroferograma (0).

Objetivo 3: Establecer si las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de triatomino de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana están significativamente diferenciadas, en base a las frecuencias alélicas de tres marcadores microsatélites.

Para esto se realizó la comparación entre pares de poblaciones del parásito, provenientes de las regiones estudiadas. Como Se observa en la **Tabla IV**, las tres localidades presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), detectadas con los tres marcadores microsátélites: SCLE10, SCLE11 y MCLE01.

Tabla IV. Comparación estadística de las frecuencias alélicas de los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01 entre pares de poblaciones de *T. cruzi*, provenientes de tres regiones chilenas estudiadas, utilizando la Prueba Exacta de G con el programa Genepop.

Locus marcador	Regiones de origen del par de poblaciones de <i>T. cruzi</i> comparadas	Valor de p
SCLE10	V y III	0.00000
SCLE10	RM y III	0.00000
SCLE10	RM y V	0.00000
SCLE11	V y III	0.00211
SCLE11	RM y III	0.00033
SCLE11	RM y V	0.00399
MCLE01	V y III	0.00004
MCLE01	RM y III	0.00000
MCLE01	RM y V	0.00020

El análisis fue realizado mediante el programa Genepop versión 4.0.7 y los parámetros de la cadena de Markov. Para este análisis se consideraron los clones predominantes de *T. cruzi* de cada muestra de triatomino encontrada en la Región de Valparaíso (V), Atacama (III) y Metropolitana (RM).

En la **Tabla V** se muestra la significancia de las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de las regiones de Atacama, Valparaíso y

Metropolitana, al ser analizados los tres loci de microsatélites en conjunto, mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Como se observa en esta Tabla, las tres poblaciones presentaron diferencias significativas altas, en base a la comparación de sus frecuencias alélicas.

Tabla V. Resultados de la comparación estadística de las frecuencias alélicas de los tres loci de microsatélites en pares de poblaciones de *T. cruzi*, provenientes de tres regiones chilenas estudiadas, utilizando el método exacto de Fisher.

Regiones de origen del par de poblaciones comparadas	Valor de p
III y V	Altamente significativa ^a
III y RM	Altamente significativa ^a
V y RM	Altamente significativa ^a

^a Al menos dos de las pruebas individuales combinadas arrojaron un valor estimado de p igual a cero.

El análisis fue realizado mediante el programa Genepop versión 4.0.7. mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Para este análisis se consideraron los clones predominantes de *T. cruzi* de cada muestra de triatomino encontrada en la Región de Valparaíso (V), Atacama (III) y Metropolitana (RM).

Objetivo 4: Identificar linajes y frecuencia de linajes presentes en las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de tres regiones chilenas y establecer si existen diferencias significativas entre las frecuencias detectadas.

La determinación de linajes se pudo realizar en 66 de las 109 muestras en estudio. Como se muestra en la **Tabla VI**, el resultado de este análisis ordenó las poblaciones de *T. cruzi* analizadas en cuatro grupos, TcI, TcII, TcIII y H (TcV – TcVI). Los linajes detectados con mayor frecuencia en el total de muestras estudiadas fueron TcI (39,4%) y TcIII (39,4%). Al comparar la distribución de linajes por región, se observó que la región de Atacama no presentaba clones predominantes de *T. cruzi* pertenecientes al grupo H y, por el contrario, el linaje TcIII (63,6%) fue claramente el más frecuente. En cuanto a las regiones de Valparaíso y Metropolitana, los linajes TcI y TcIII fueron los detectados mayoritariamente, presentando en ambas regiones frecuencias muy similares: 43,9% - 34,1% y 35,7% - 35,7%, respectivamente. Sin embargo, al comparar las frecuencias de los cuatro linajes detectados entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,76$).

Tabla VI. Distribución y frecuencia de linajes de los clones predominantes de *T. cruzi* encontrados en triatomos capturados en tres regiones chilenas estudiadas, mediante análisis de microsatélites.

Linajes	Número y porcentaje de clones predominantes en cada región			Total
	Atacama n=11	Valparaíso n=41	Metropolitana n=14	n= 66
TcI	3 (27,3)*	18 (43,9)	5 (35,7)	26 (39,4)
TcII	1 (9,1)	5 (12,6)	3 (21,4)	9 (13,6)
TcIII	7 (63,6)	14 (34,1)	5 (35,7)	26 (39,4)
H (TcV –TcVI)	0	4 (9,8)	1 (7,1)	5 (7,6)

*Entre paréntesis aparece el porcentaje al que corresponde cada frecuencia respecto del total de muestras.

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron 109 muestras de *T. cruzi* obtenidas del mismo número de triatomíneos provenientes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, mediante tres marcadores microsatélites. Al analizar la distribución de clonalidad en muestras de triatomíneos, se observó que el 67% de ellas presentaba más de un clon. Estos resultados concuerdan con lo descrito en literatura respecto de que las poblaciones presentes en triatomíneos son principalmente multiclonales, lo cual podría deberse a que pacientes en áreas endémicas pueden estar infectados por múltiples contactos con diferentes triatomíneos y estos a su vez, pueden alimentarse de diferentes individuos infectados (Macedo *et al.*, 2002). Sin embargo, las muestras multiclonales se componían, principalmente, de 2 clones (35,6% de las muestras multiclonales). El número de muestras disminuyó progresivamente en relación al aumento del número de clones presentes en ellas. En consecuencia, en este trabajo se detectó con mayor frecuencia la presencia de muestras con uno (33%) y dos (23,8%) clones, las que en conjunto representaron el 56,8% del total de las muestras analizadas. Estos resultados podrían reflejar una disminución del número de triatomíneos en las regiones endémicas como resultado de la implementación del Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans* llevado a cabo desde 1991 por el Ministerio de Salud, pues al disminuir el número de insectos vectores se reduciría la probabilidad de contacto entre el vector y los hospederos animales y/o humanos. De esta manera la infección de los triatomíneos con un mayor número de clones de *T. cruzi* se habría restringido y por consiguiente, habría disminuido la diversidad clonal presente en estos insectos vectores. La amplificación de microsatélites mediante PCR permitió identificar los clones de *T. cruzi* directamente en las muestras de los triatomíneos analizados. Además, permitió determinar la clonalidad de las poblaciones de *T. cruzi*, obtenidas de triatomíneos y asignar el genotipo de los clones predominantes en cada una de ellas.

Luego, al analizar las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, mediante la Prueba Exacta de G y el método de Fisher, se encontró que estas tres poblaciones estaban significativamente diferenciadas. Esto se podría explicar, en primera instancia, por la disminución del tamaño poblacional de los insectos triatomíneos como consecuencia de los sistemas de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud y el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T.*

infestans. El menor tamaño poblacional de los triatominos habría interferido en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, debido a la menor probabilidad de contacto entre hospederos y vectores, disminuyendo así la posibilidad de dispersión del parásito entre regiones y, consecuentemente, disminuyendo el flujo génico entre sus poblaciones.

En segundo lugar, el tipo de reproducción principalmente clonal de *T. cruzi*, favorecería el mínimo flujo génico entre poblaciones, donde cada clon representa un linaje que se reproduce por división binaria y queda inalterado hasta que ocurra una mutación (Oliveira *et al.*, 1998). Por otra parte, las barreras geográficas así como la distancia presente entre estas tres regiones, son factores que mantendrían el bajo flujo génico entre las poblaciones de *T. cruzi* al impedir la dispersión de los vectores de este parásito. Además, las diferencias geográficas, climáticas y demográficas entre las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana (Apt *et al.*, 1987) constituyen ambientes y nichos ecológicos distintos que se asocian con la presencia de diferentes mamíferos peridomésticos como posibles reservorios de *T. cruzi* (Rozas *et al.*, 2007). En conjunto, los factores mencionados probablemente generan las condiciones necesarias para determinar el origen de poblaciones genéticamente diferentes de este parásito. Sin embargo, en este estudio no se puede descartar el efecto de la deriva génica, dado el número de muestras presentes en las regiones de Atacama y Metropolitana, hecho que podría sobrestimar estas diferencias.

Por último, la distribución y frecuencia de linajes de las poblaciones de *T. cruzi* en estudio se determinó comparando, mediante el programa GeneClass, los resultados obtenidos en este estudio para los clones predominantes, con la información obtenida de literatura sobre clones de *T. cruzi* de linaje conocido (De Freitas *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009). Este análisis se realizó con las 109 muestras de *T. cruzi* analizadas, 66 de las cuales (60,6%) alcanzaron sobre un 70% de confiabilidad, razón por la cual estas muestras fueron las consideradas para este estudio. Los linajes más frecuentes detectados en el total de clones predominantes de *T. cruzi* fueron TcI (39,4%) y TcIII (39,4%), seguidos de los linajes TcII (13,6%) y H (TcV-TCVI) (7,6%). Estos resultados concuerdan parcialmente con la distribución de linajes de *T. cruzi* encontrada en poblaciones de triatominos del género *Mepraia*, provenientes de dos áreas diferentes de la región de Coquimbo, analizadas por pruebas de KDNA (Coronado *et al.*, 2009). En el reporte de Coronado *et al.* (2009), el linaje de *T. cruzi* encontrado con mayor frecuencia en el contenido intestinal de ambas poblaciones fue TcI, seguido por los linajes TcII, TcV y TcVI, con frecuencias

más bajas. En el estudio mencionado no se pudo identificar genotipos en un 20,9% y 39,1% de las muestras de *T. cruzi* en cada una de las poblaciones estudiadas, las cuales se asociaron a los linajes TcIV ó TcIII. Estos antecedentes sugieren que, probablemente, el linaje TcI sería el linaje predominante en Chile, sin embargo, se requiere estudiar las poblaciones restantes del territorio endémico para poder establecer con mayor precisión la distribución de linajes de *T. cruzi* en nuestro país. Por otra parte, en el presente estudio, se observó que la diversidad de linajes presente en las tres regiones es bastante similar, sin embargo, al comparar la distribución de linajes, encontramos que la región de Atacama presenta diferencias con respecto a las regiones de Valparaíso y Metropolitana y que estas últimas exhiben frecuencias de linajes muy similares. De esta manera, resulta interesante que la frecuencia del linaje TcIII observada en la región de Atacama (63,6%) correspondía casi al doble de las frecuencias de este linaje encontradas en las regiones de Valparaíso (34,1%) y Metropolitana (35,7%). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,76$), por lo que se requiere realizar nuevos estudios al respecto en base a un mayor número de muestras y considerando las limitaciones en la determinación de linajes de *T. cruzi*. Así, en este estudio fue posible realizar la asignación de linajes de *T. cruzi* a un 60,6% de las muestras, quedando excluidas 43 muestras de triatomos, situación similar a lo ocurrido en otros estudios (Coronado *et al.*, 2009; Venegas *et al.*, 2010).

6. CONCLUSIONES

- Las poblaciones de *T. cruzi* analizadas, estaban genéticamente diferenciadas, lo que apoya la hipótesis propuesta en este estudio.
- Las muestras de *T. cruzi* procedentes del contenido intestinal de triatominos capturados en las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana presentan un predominio de poblaciones multiclonales del parásito (67%).
- Los linajes TcI y TcIII de *T. cruzi* son los más frecuentemente detectados en los triatominos de las tres regiones en estudio.
- No se detectaron diferencias significativas en las frecuencias de los linajes TcI, TcII, TcIII e híbridos (TcV y TcVI) entre las tres regiones en estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **ANÓN.** 2008. Manual de normas de Bioseguridad. 2ª ed. Fondecyt-Conicyt. Santiago, Chile. 139 pp.
- **APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; GOMEZ, L.; MILES, M.; WIDMER, G.** 1987. Characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am J Trop Med Hyg* 37: 302–307.
- **APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol al Día* 14: 23-40.
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.** 2008. Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infectol* 25: 189-193.
- **ATIAS, A.; APT, W.** 1992. Enfermedad de Chagas. In: Atias, A.; Neghme, A. *Parasitología clínica*. 3ª ed. Publicaciones técnicas mediterráneo; Santiago, Chile. 255-268 pp.
- **BARNABE, C.; TIBAYRENC, M.; MARCONDES, C.B.** 2005. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* natural clones from the state of Paraíba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(3): 273-275.
- **BOTTO-MAHAN, C.; SEPÚLVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUÑA-RETAMAR, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing

bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. Acta Trop 105: 166-169.

- **BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M.** 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ª ed. Publicaciones Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. 379-388 pp.

- **BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; BASTRENTA, B.; YACSIK, N.; NOIREAU, F.; ALCAZAR, J.L.; BARNABE, C.; WINCKER, P.; TIBAYRENC, M.** 1998 Different behaviour of two *Trypanosoma cruzi* major clones: Transmission and circulation in young Bolivian patients. Exp Parasitol 89: 285–295.

- **BRISSE, S.; BARNABÉ C.; TIBAYRENC, M.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 30(1): 35-44.

- **COÑOEPÁN, W.** 2006. Estudio de aislados y clones de *Trypanosoma cruzi* procedentes de pacientes chagásicos, mediante el análisis de microsatélites. Memoria Título Bioquímico, Chile. U. Santiago de Chile, Fac. Química y Biología, 16-20 pp.

- **CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ALBRECHT, H.; ROSAS, M.** 2006 Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. Am J Trop Med Hyg. 74: 1008-1012.

- **CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTAN, P.; SOLAR, A.** 2009. Molecular Epidemiology of Chagas Disease in the Wild Transmission Cycle: The Evaluation in the Sylvatic Vector *Mepraia spinolai* from an Endemic Area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81(4): 656–659

- [DE FREITAS, JM.](#); [AUGUSTO-PINTO, L.](#); [PIMENTA, JR.](#); [BASTOS-RODRIGUES, L.](#); [GONÇALVES, VF.](#); [TEIXEIRA, SM.](#); [CHIARI E.](#); [JUNQUEIRA, AC.](#); [FERNANDES, O.](#); [MACEDO, AM.](#); [MACHADO, CR.](#); [PENA, SD.](#) 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2: 226-235.

- **DIAZ, JH.; CLAIBORNE, W.C.** 2007. Re-emerging Chagas disease (American Trypanosomiasis): Old Problems without Modern Solutions. *Trop. med health* 35 (4): 329-336.

- **GASCHE, C.; CHANG, C.L.; NATARAJAN, L.; GOEL, A.; RHEES, J.; YOUNG, D.J.; ARNOLD, C.N.; BOLAND, R.** 2003. Identification of frame-shift intermediate mutant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1914-1919.

- **GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D.** 1997 Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *J. Hered.* 88: 335-342.

- **HARTL, D.L.; CLARK, A.G.** 1997. Population Substructure. **In:** Hartl, D.L.; Clark, A.G. *Principles of Population Genetics*, 3^a ed. Sinauer Association Massachusetts, USA. 111-162 pp.

- **LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERN.** 7-20.2009. Trypanosomiasis, American. [en línea]. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmericani.htm> [consulta: 17-11-2011]
-
-
- **MACEDO, A.M.; PIMENTA, J.; AGUIAR R.S.; MELO A.I.R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.J.; OLIVEIRA R.P.** 2001. Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 407-413.
- **MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J.** 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Rev Mol Med 4(5): 1-16.
- **MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J.** 2004 *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, pp 1-12.
- **MACHADO, CA.; AYALA, FJ.** 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci 98:7396-7401.
- **MIRANDA, S.** 2007. Tipificación mediante microsatélites de los clones de *Trypanosoma cruzi* presentes en triatomíneos y pacientes chagásicos crónicos chilenos. Memoria Título Biólogo. Santiago, Chile. U. Arturo Prat, Depto. Ciencias del mar. 12-42 p.

- **OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D.** 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3776-80.

- **PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A.** 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection, pp 536-539.
- **PIZARRO, J.C.; GILLIGAN, L.M.; STEVENS, L.** 2008 Microsatellites Reveal a High Population Structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. PLoS Negl Trop Dis 2(3): 202.

- **RANNALA, B.; MOUNTAIN, J.L.** 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc Natl Acad Sci USA 94: 9197–9201.

- **RAYMOND, M.; ROUSSET, F.** 1995a. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered 86: 248-249.

- **RAYMOND, M. ; ROUSSET, F.** 1995b. An exact test for population differentiation. Evolution 49: 1283-1286.

- **ROZAS, M.; BOTTO- MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Wild and Peridomestic Mammals in Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg, 77(4): 647-653.

- **SCHOFIELD, C.J.** 2000. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad Saude Publica* 16: 105-112.

- **SILVEIRA, P.; LANA, M.; BRITTO, C.; BASTRENTA, B.; TIBAYRENC, M.** 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* bicolon infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int J Parasitol* 30: 843–848.

- **VENEGAS, J.; COÑOEPAN, W.; PICHUANTES, S.; MIRANDA, S, JERCIC, MI.; GAJARDO, M.; SÁNCHEZ, G.** 2009. Phylogenetic analysis of microsatellite markers further supports the two hybridization events hypothesis as the origin of the *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol Res* 105: 191-199.
- **VENEGAS, J.; MIRANDA, S.; COÑOEPAN, W.; PICHUANTES, S.; JERCIC, MI.; GONZÁLEZ, C.; GAJARDO, M.; APT, W.; ARRIBADA, A.; SÁNCHEZ, G.** 2010. Microsatellite marker analysis shows differentiation among *Trypanosoma cruzi* populations of peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on the same chronic chagasic patients microsatellite marker analysis and *T. cruzi*. *Exp. Res* 107: 855–863.

- **WESTENBERGER, S.J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, DA.; STURM, NR.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.

- **WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.; RASSI, A.** 1992. Chagas disease (american tripanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT sociedad brasileira de hematología y hemoterapia. Brasil, 49-80 pp.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2002. Control of Chagas Disease. Tech Reports Series. 905: 1-109.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2007. Report on the Chagas Disease. In: Special Program for the Research and Training of Tropical Diseases (TDR). Geneva, Switzerland. 17-20 abril 2005. UNICEF – PNUD – Banco mundial – WHO. 1-104 pp.

- **XAVIER, A.; VAZ A,C, P.S. D'ANDREA C, L. HERRERA A, L. EMPERAIRE E, J.R. ALVES E, O. FERNANDES D, L.F. FERREIRA B, A.M. JANSEN.** 2007. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitol Int* 56: 119–128.

- **ZULANTAY, I.; BOZÁN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L.C.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA J.L.; APT W.** 2004 Chronic Chagas disease: Absence of intradomiciliary *Triatoma infestans* and persistence of circulating post-therapy. *Parasitol Latinoam* 59: 93–98.

- **ZINGALES, B.; ANDRADE, SG.; BRIONES, MRS.; CAMPBELL, DA.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL F, LAGES-SILVA, E.; MACEDO, AM.; MACHADO, CR.; MILES, MA.; ROMANHA, AJ.; STURM, NR.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, AG.** 2009. A new consensus for *T. cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.