



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN MOLECULAR DE
CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* Y SU ANÁLISIS
FILOGENÉTICO MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN
PARA CITOCROMO B

LUIS CÓRDOVA MONTECINOS

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

PROFESOR GUÍA: ÁNGEL SPOTORNO OYARZUN

SANTIAGO, CHILE
2007

*Dedicada a mi hija
Catalina*

*“La vida es aquello que te
sucede mientras estas
ocupado haciendo otros
planes”*

John Lennon

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres Edith Montecinos y Luis Córdova por el constante e incondicional apoyo que me dieron, espero ser tan buen padre como ellos lo han sido conmigo, siempre estuvieron cuando los necesite junto a mis hermanos, Nuria, Pablo y Javiera, para guiarme y darme fuerzas y su inmenso cariño para así lograr mis sueños,

A mi mujer Ximena y mi hermosa hija Catalina, por su eterno amor y confianza, su respaldo me empujo a alcanzar mis metas. Estaré siempre en deuda con ustedes, pero se que tengo toda la vida para recompensarlas.

A mi profesor Guía, Dr Ángel Spotorno, por brindarme su amistad, paciencia y constante apoyo durante el desarrollo de esta Memoria. Estaré por siempre agradecido.
A Militza Derprich quien me introdujo en los secretos del trabajo en laboratorio.

Deseo agradecer a la Universidad de Chile por ofrecerme la oportunidad de asumir el reto de convertirme en Médico Veterinario.

A todos mis amigos los cuales siempre ocuparan un lugar en mi corazón

Y a todas aquellas personas que colaboraron de una u otra manera durante los años de formación profesional.

A todos ellos gracias

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, como agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), existirían alrededor de 18 millones de personas infectadas en el continente. A su vez, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que en el cono sur alrededor de 50 millones de personas están expuestas al riesgo de infectarse.

El conocimiento de la magnitud de la infección chagásica, su repercusión sobre la salud y la economía de los países latinoamericanos, varía grandemente, en especial, sus formas clínicas. La caracterización genética de las variedades de *T. cruzi* es de suma importancia, debido a la considerable heterogeneidad genética y biológica en las poblaciones de este parásito. Se han descritos previamente dos linajes filogenéticos importantes, ambos muy heterogéneos; *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. En la presente memoria se han caracterizado nueve cepas a través de la secuenciación del gen para citocromo b y su posterior análisis filogenético, el cual se realizó junto al total de cepas descritas en GenBank para citocromo b de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos muestran una topología que divide las diferentes cepas en tres Clados principales (Clado A, B y C), lo cual reafirma resultados obtenidos en diversos estudios previos. Las muestras chilenas se distribuyen en los tres clados, pero principalmente en el Clado A, cuyas cepas están clasificadas como *T. cruzi* I según la nomenclatura internacional.

SUMMARY

The *Trypanosoma cruzi*, like etiologic agent of the disease of Chagas, is of the main problems of public health in diverse Latin American countries. In agreement with the Pan-American Organization of Salud (OPS), they would exist around 18 million people infected in the continent. The World-wide Organization of the Health (the OMS) indicates as well that in the South cone around 50 million people they are exposed to the risk of becoming infected.

The knowledge of the magnitude of the chagásic infection, its repercussion on the health and the economy of the Latin American countries, vary greatly, in special, its clinical forms. The genetic characterization of the varieties of *T. cruzi* is of extreme importance, due to the considerable genetic and biological heterogeneity in the populations of this parasite. Two important phylogenetic lineages have been described previously, both very heterogenous; the *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. In the present memory nine stocks through the secuenciación of the gene for citocromo b and its later phylogenetic analysis have been characterized, which it made next to the total of described stocks in GenBank for citocromo b of *T. cruzi*. The obtained results show a topology that divides the different main stocks in three Clades (Clade A, B and C), which reaffirms results obtained in diverse previous studies. The chilean samples are distributed in the three clades, but mainly in the Clade A, whose stocks are classified like *T. cruzi* I according to the international nomenclature.

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN	1
II.- Revisión bibliográfica.	3
2.1. Trypanosoma cruzi.	3
2.1.1. Taxonomía.	3
2.1.2. Morfología.	3
2.2. Epidemiología de la Infección.	5
2.3. Patología.	8
2.3.1. Ciclo evolutivo.	8
2.3.2. Enfermedad de Chagas.	10
2.3.3. Diagnóstico.	13
2.3.4. Tratamiento.	15
2.4. Criterios De Identificación.	16
2.5. Estudios Filogenéticos.	19
2.5.1. Criterios para análisis filogenéticos.	19
2.5.2. Filogenia de Trypanosomas.	21
III OBJETIVOS.	22
IV MATERIAL Y MÉTODO.	23
4.1. Muestras analizadas.	23
4.2. Amplificación de DNA a partir de la técnica PCR.	25
4.2.1- Diseño de partidores.	25
4.2.2.- Amplificación del gen para citocromo b de T. cruzi.	25
4.3.- Análisis y Purificación de los fragmentos amplificados.	26
4.4.- Análisis de las secuencias del gen para citocromo b.	28
4.5.- Análisis filogenético de las cepas secuenciadas a partir del gen para citocromo b.	28
4.5.1.- Máxima Parsimonia.	29

4.5.2.- Análisis de distancia.	29
4.5.3.- Máxima Verosimilitud.	30
V RESULTADOS.	31
5.1.- Amplificación de los fragmentos mediante la técnica PCR.	30
5.2.- Análisis de las secuencias del citocromo b.	32
5.3.- Composición nucleotídica.	32
5.4.- Variabilidad de las secuencias.	34
5.5.- Relaciones evolutivas.	37
5.5.1.- Máxima parsimonia.	37
5.5.2.- Distancia.	40
5.5.3.- Máxima Verosimilitud.	43
VI DISCUSIÓN.	45
6.1.- Composición nucleotídica del gen para citocromo b.	45
6.2.- Variabilidad de las secuencias para citocromo b.	46
6.3.- Relaciones Filogenéticas.	46
VII CONCLUSIONES.	49
VIII BIBLIOGRAFÍA.	50

I INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas se define como la infección de mamíferos producida por el protozoo flagelado del orden *Kinetoplastida*, el *Trypanosoma cruzi*. En el hombre, la infección puede ser congénita o adquirida y afecta, en grado variable, diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo, produciendo cardiomegalia, megaesófago y megacolon entre otras afecciones (Atías, 1998). Esta patología y sus componentes epidemiológicos fueron descubiertos en Brasil por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas en 1909 durante su trabajo en la campaña antimalarica en Minas Gerais. (Lewinsohn, 1981)

Su principal mecanismo de transmisión es un vector biológico, que involucra a artrópodos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Canals y Cattán, 1992). En Chile son conocidos con el nombre común de vinchucas, correspondiendo *Triatoma Infestans* al insecto propio del ciclo domiciliario y peridomiciliario, y *Mepraia spinolai* del ciclo silvestre (Atías, 1998).

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), existirían alrededor de 18 millones de personas infectadas en el continente (Anón, 1996; Schmunis, 1994). A su vez, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que en el cono sur alrededor de 50 millones de personas están expuestas al riesgo de infectarse (Anón, 2003; Schmunis, 1994).

Los triatomas que transmiten la infección por *T. cruzi*, se distribuyen en un área que se extiende desde el paralelo 43° de latitud norte (sur de California), hasta el paralelo 49° de latitud sur (región central de Argentina). En esta extensa región, prevalecen las condiciones ecológicas favorables para la transmisión y la mantención de la parasitosis. En Chile, el área de endemia se extiende desde el paralelo 18° en el norte (I Región), hasta el paralelo 34° (VI Región) (Anón, 1996). El número de individuos infectados alcanzaría alrededor de los 370.000 habitantes, con una incidencia de 8 mil casos/año (Hayes y Schofield, 1990)

En la forma adquirida de la enfermedad de Chagas, se distinguen tres períodos: agudo, latente o indeterminado y crónico. Los cuadros agudos son excepcionales; sin

embargo, la cardiopatía y los megasíndromes digestivos son frecuentes en la etapa crónica de la enfermedad. Cerca del 30% de los individuos infectados desarrollan cardiopatía chagásica crónica, la forma más severa de la enfermedad (Prata, 1990) y un 6-8% de enfermos chagásicos desarrolla trastornos del tubo digestivo, los cuales se traducen en la formación de megaesófago y megacolon. En las etapas avanzadas el esófago prácticamente no transporta su contenido, dado lo cual los pacientes se desnutren y sufren de frecuentes infecciones del tracto respiratorio (Brener *et al.*, 2000).

El conocimiento de la magnitud de la infección chagásica, su repercusión sobre la salud y la economía de los países latinoamericanos, varía grandemente, en especial, sus formas clínicas. En esta situación influye la deficiente investigación clínica, la falta de recursos para el diagnóstico, la ausencia de estudios anatomopatológicos, y los aislados intentos por caracterizar las poblaciones de *T. cruzi* (Atías, 1998). Este último, es uno de los temas principales de este estudio que, además de determinar cepas mediante métodos moleculares, intenta también caracterizar filogenéticamente las distintas poblaciones mediante secuenciación del gen para el citocromo *b* a partir del DNA mitocondrial del *T. cruzi*.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Trypanosoma cruzi*

2.1.1. Taxonomía.

El *T. cruzi* es un protozoo mastigoforo perteneciente al phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, Clase *Zoomastigophorea*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, que se caracterizan por la existencia en su única mitocondria de una estructura que contiene DNA, el kinetoplasto. El DNA mitocondrial de los tripanosomátidos es muy inusual, se llama DNA kinetoplastídico (kDNA), el cual representa cerca del 20% del DNA total del parásito. Está formado por minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (20 kpb) de DNA encadenados formando una compleja red compacta (Brener *et al.*, 2000).

Debido a su característica de desarrollar formas infectantes en el interior del tracto digestivo del vector y contaminar al mamífero por medio de las deyecciones de éste, integra la sección Stercoraria, al igual que otros tripanosomátidos. El nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi*, ya que su multiplicación en los vertebrados se realiza a nivel intracelular, característica del subgénero *Schizotrypanum*. (Atías, 1998; Lee y Huntner, 1985)

2.1.2. Morfología.

El parásito se originó en áreas silvestres del continente Americano, de donde evolucionó y se adaptó hacia el ciclo doméstico de la infección, por medio de diversos procesos ecológicos y modificaciones antrópicas del medio (Forattini *et al.*, 1971). En sus diversos hospederos y en medios de cultivos, *T. cruzi* puede presentar tres aspectos morfológicos fundamentales: tripomastigote, epimastigote y amastigote (Atías, 1998).

a) Tripomastigote:

Se encuentra en el contenido rectal del vector y en la sangre de los mamíferos infectados. Su aspecto es fusiforme de 16-20µm de largo y 2-4µm de ancho. Posee un núcleo ovalado

ubicado en el tercio medio del cuerpo, y posterior a él se encuentra el Kinetoplasto, del cual sale un flagelo que recorre la parte externa del parásito, como una membrana ondulante, exteriorizándose en la parte anterior. (figura N° 1)



Figura 1: *T. cruzi* en estado de Tripomastigote Microscopía electrónica de barrido. (Tomado de Universidade Federal de São Paulo, 2007)

b) Amastigote:

Son esféricos, de 2-5 μ m de diámetro, poseen un núcleo redondo, un kinetoplasto en forma de barra, y no presentan flagelo visible. Su localización es exclusivamente dentro de las células del mamífero infectado, en las cuales se multiplica. Estas inicialmente son células del sistema fagocítico mononuclear, y posteriormente células musculares, cardíacas, intestinales y esqueléticas. (Figura N° 2)

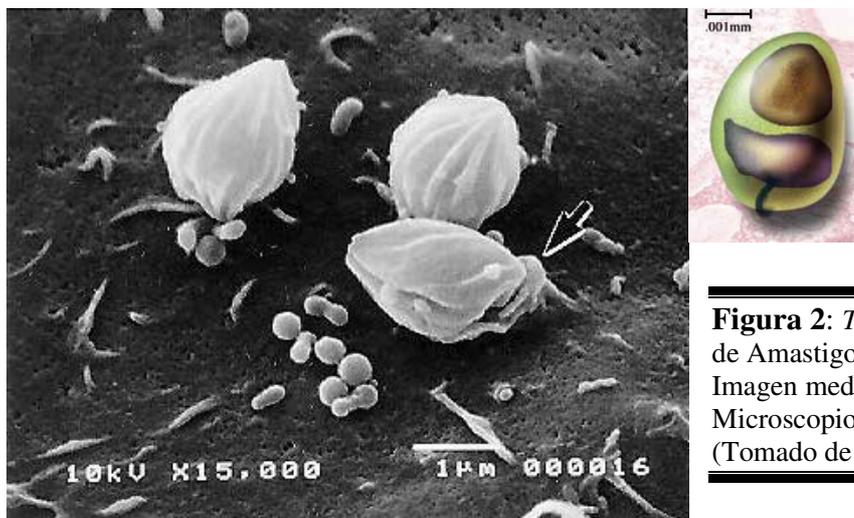


Figura 2: *T. cruzi* en estado de Amastigote Imagen mediante Microscopio electrónico de barrido. (Tomado de Procópio *et al*, 1999)

c) Epimastigote:

Es la forma de multiplicación en el intestino del vector, son alargados y miden 10-15 μ m de largo y 1-3 μ m de ancho, su núcleo es ovalado y por delante de él se encuentra el kinetoplasto, del cual sale un flagelo con una corta membrana ondulante, que pronto se hace libre en el extremo anterior.

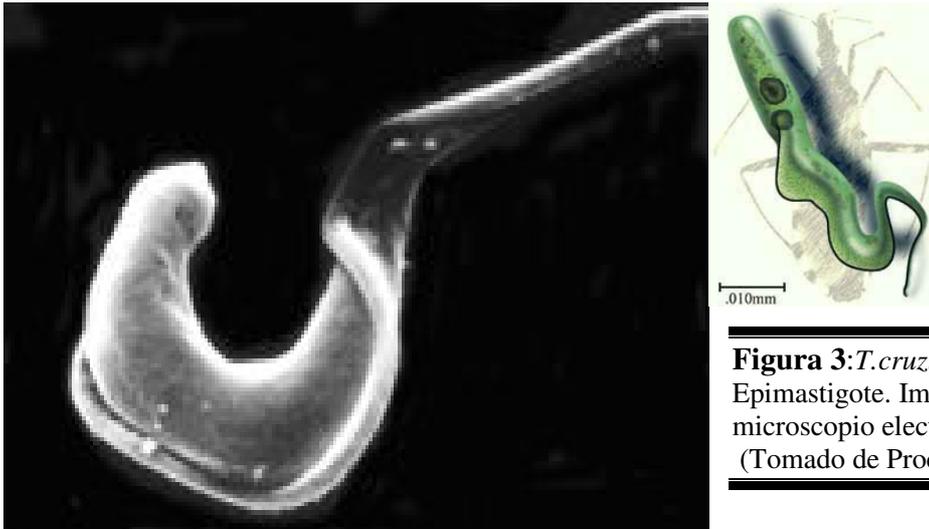


Figura 3: *T. cruzi* en estado de Epimastigote. Imagen de microscopio electrónico de barrido. (Tomado de Procópio *et al*, 1999)

2.2. Epidemiología de la Infección.

La enfermedad de Chagas es la parasitosis más importante en Latinoamérica, constituyendo un grave problema en la Salud Pública.

El ciclo enzoótico de la enfermedad de Chagas se extiende por todo el continente americano, aproximadamente entre las latitudes 42° Norte (sur de California) y 46° Sur (región central de Argentina y Chile) (Figura N° 4), las cuales presentan las condiciones ecológicas favorables para la transmisión y manutención de la enfermedad. Por otro lado, la infección humana a través del vector ha sido reportada entre el norte de México y la latitud 46° Sur, áreas donde los triatominos se han domiciliado (Anón, 1996).

En estas áreas, la OMS ha estimado que existirían cerca de 18 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, con una incidencia aproximada de 500 mil casos nuevos al año.

De los individuos infectados, 5 millones, por lo menos, presentarían síntomas relacionados con la enfermedad y 90 millones de personas se encontrarían expuestas a contraer la infección.



Figura 4: Área geográfica en la cual se extiende el ciclo enzoótico de la enfermedad de Chagas. (Tomado de Medicinet., 2007)

En Argentina, se estima que 2,5 millones de individuos estarían infectados y que alrededor de 10 millones estarían en riesgo de adquirir la enfermedad. En Bolivia el 55% del territorio es considerado como área endémica, con una población rural de 1 millón de personas, donde las tasas de infección varían del 26% hasta el 71% en niños de 1 a 6 años, y del 32% hasta el 94% en adultos. Brasil, con una población de 6 millones de individuos infectados, representa el país con mayor incidencia de la enfermedad de Chagas, alcanzando 170.000 casos/año (Anón, 1996). En países centroamericanos, como Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Honduras, El Salvador y Guatemala, la seroprevalencia fluctúa, en orden creciente, entre 67.000 y 730.000 casos (Anón, 1996; Anón, 2003). México con una población de chagásicos que alcanza casi los 1,7 millones, representa para Estados Unidos un grave problema, debido a las importantes migraciones poblacionales que se producen en ese país (Brashear *et al.*, 1995.; Holbert *et al.*, 1995).

El principal vector en el hombre es el *T. infestans*, cuyo biotipo es característico del paisaje agreste; su hábitat es domiciliario y peridomiciliario, infestando la vivienda campesina alimentándose con la sangre del hombre y de los animales domésticos y silvestres (Lent y Wygodzinsky, 1979). Desde esta situación eminentemente rural, el insecto ha invadido los alrededores de las zonas urbanas, las cuales constituyen centros de atracción industrial con una importante emigración de personas. Según estudios en las zonas de endemia, un tercio de los triatomas está infectado con *T. cruzi*. En algunas zonas rurales del norte de nuestro país, se encuentra el vector *M. spinolai*, responsable de la mantención de un ciclo de infección silvestre, pero con poca trascendencia para la transmisión de *T. cruzi* al hombre. La prevalencia de la infección en éste, determinada mediante la aplicación del xenodiagnóstico, varía entre 8 y 11%, pero aumenta a 18% al emplearse pruebas serológicas (Ordenes *et al.*, 1996). En Chile las formas crónicas, la cardiopatía y principalmente las megaformaciones digestivas, son frecuentes; en cambio, las formas agudas son excepcionales, salvo las congénitas (López *et al.*, 2001).

El hombre puede infectarse con *T. cruzi*, mediante diversos mecanismos:

- Por las deyecciones de triatomos, siendo éste el mecanismo más importante. El insecto, al picar en zonas descubiertas de la piel del hombre durante el sueño, elimina sus heces con los tripomastigotes metacíclicos que penetran por el sitio de la picadura o por las mucosas (Atías, 1998);
- Por la placenta, lo que determina la infección congénita. Una madre infectada puede transmitir los *T. cruzi* circulantes en su sangre durante la segunda mitad de gestación (Anon, 2000; Muñoz *et al.*, 1992; Schenone *et al.*, 1985);
- Por las transfusiones sanguíneas, lo que constituye un peligro real, puesto que el *T. cruzi* mantiene su vitalidad en los bancos de sangre, a pesar de la temperatura del refrigerador, hasta por dos meses (Atías, 1998; Brashear *et al.*, 1995)
- Por trasplante de órganos, lo que principalmente se ha descrito por trasplante renal. (Brashear *et al.*, 1995.; Holbert *et al.*, 1995)
- Por leche materna: sería una remota posibilidad de infección. En la literatura existe un caso bien documentado de este mecanismo de transmisión (Atías, 1998).

- Por la manipulación de sangre y de animales infectados, como ocurre en las infecciones accidentales que se producen en los laboratorios que trabajan en la enfermedad de Chagas experimental, o en los individuos que descubren animales salvajes o semidomésticos infectados (Atías, 1998).

Diversos estudios han demostrado que la infección chagásica es más frecuente que ocurra en la niñez, aunque la sintomatología suele aparecer muchos años después de la primoinfección. Así también, por causas no determinadas, el compromiso visceral miocárdico o del tubo digestivo es más frecuente en el sexo masculino (Atías, 1998).

2.3. Patología.

2.3.1. Ciclo evolutivo.

Bajo condiciones naturales, *T. cruzi* infecta más de 100 especies de mamíferos de diferentes órdenes y se transmite a través de hemípteros hematófagos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, popularmente conocidos como vinchucas (Noireau *et al.*, 1999). De los 16 géneros distintos que son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, los más importantes son *Pastronylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*. En Chile existen dos ciclos de transmisión para *T. cruzi*, cada uno de ellos dependiente de una especie diferente de estos insectos: el silvestre, relacionado con *M. spinolai*, autóctono de nuestro país (Canals y Cattán 1992), que generalmente involucra hospederos vertebrados animales y el ciclo doméstico, dependiente de *T. infestans*, que involucra humanos y animales domésticos. (Atías, 1998).

Los hemípteros hematófagos se infectan al ingerir sangre de mamíferos que contiene tripomastigotes. En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican muy activamente como epimastigotes y, al cabo de 15 a 30 días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma. Cuando el insecto pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes. De esta manera, la forma infectante del *T. cruzi* es depositada pasivamente en la piel, penetrándola por la herida que causa la picadura o por lesiones de continuidad existentes previamente como también por las mucosas (Brener *et al.*, 2000). Al momento de ingresar al hospedero, se produce una reacción inflamatoria local

aguda, donde algunos tripomastigotos son fagocitados por células macrofágicas y otros penetran en las células del tejido celular laxo y monocitos derivados de células dendríticas (Van Overtvelt *et al.*, 1999). En el interior de ambas células comienzan a multiplicarse activamente por fisión binaria, transformándose en amastigotes, los cuales, posteriormente se diferencian a tripomastigotes y salen a circulación para invadir nuevos tejidos, en especial células del sistema reticulo endotelial (Tanowitz *et al.*, 1999), músculo cardíaco (Acquatella, 1998), esquelético y liso (Cardoni, 1997) y sistema nervioso central (Schmunis, 1994). Este ciclo de circulación sanguínea y de invasión celular se repite numerosas veces, completándose el ciclo biológico cuando los tripomastigotes son ingeridos por otros triatominos (figura N° 5) (Atías, 1998.).

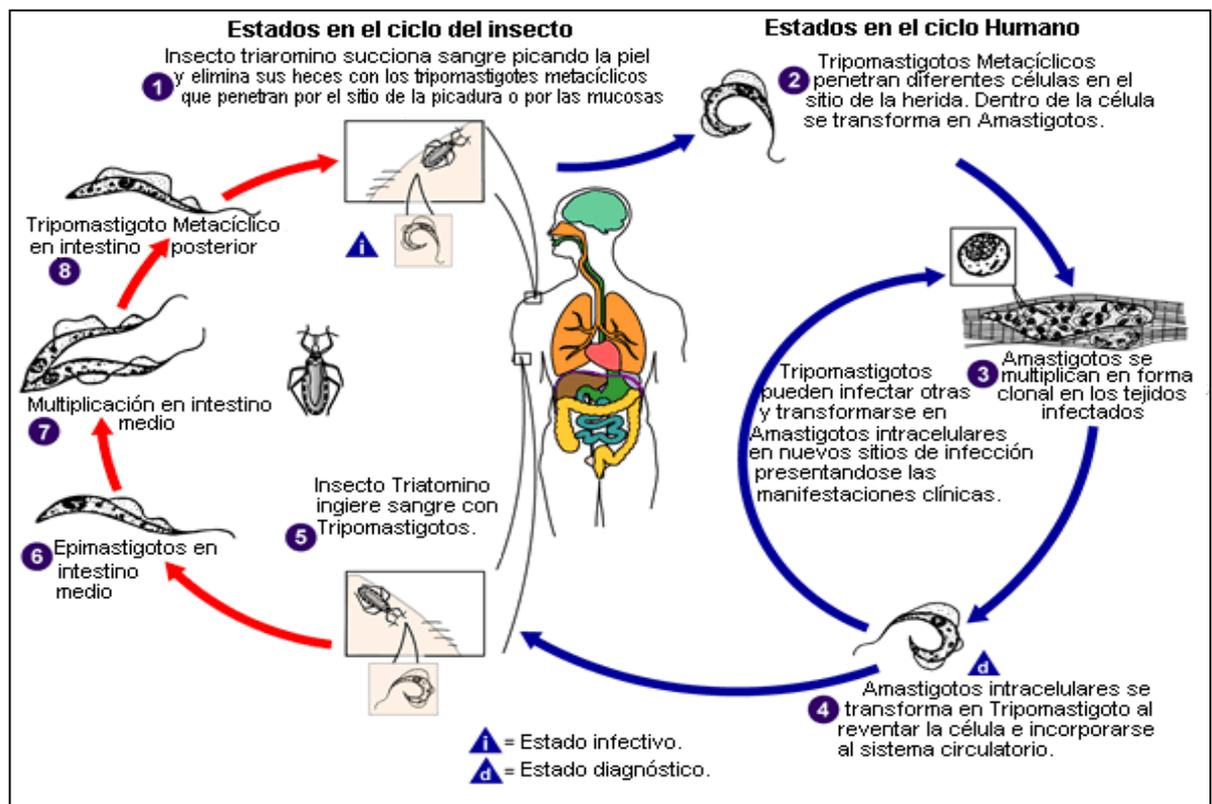


Figura 5: Ciclo biológico del *T. cruzi*. (Modificado de Centers for Disease Control and Prevention, 2007)

2.3.2. Enfermedad de Chagas.

En la enfermedad de Chagas se reconocen tres fases: una fase aguda corta, una fase crónica latente de larga duración, y finalmente una crónica, caracterizada por la aparición de secuelas (Atías, 1998).

El proceso inflamatorio, la penetración e invasión de los parásitos en los diferentes tejidos y órganos, la alta parasitemia, la respuesta local, la destrucción de las células nerviosas y musculares conducen a procesos degenerativos de grado variable, con reemplazo de estas células por tejido fibroso, caracterizando la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Cardoni, 1997; Zhang y Tarleton, 1999). Ésta puede durar algunos meses y los síntomas suelen ser leves e inespecíficos, razón por la cual sólo se diagnostica en el 1-2% de los afectados, pasando inadvertida en la mayoría de los casos (Atías, 1998; Prata, 1990). La sintomatología generalmente se observa en niños menores de 15 años (Atías, 1998; Dias y Dias, 1968), pudiendo cursar con una inflamación localizada en la puerta de entrada del *T. cruzi*, llamada chagoma de inoculación (Mazza *et al.*, 1940) o, si ocurre una infección a través de la conjuntiva o piel del párpado, puede producir una celulitis periorbitaria eritematosa, con edema unilateral bpalpebral y linfadenitis regional conocida como el signo de Romaña Mazza; o, puede presentar compromiso visceral, adquiriendo gran importancia en niños menores de dos años (Lugones, 1959; Tanowitz, *et al* 1992), los cuales pueden cursar con fiebre (Cançado, 1979; Rassi *et al.*, 1958), hepato o esplenomegalia, poliadenopatías generalizadas, miocarditis (De Andrade *et al.*, 1998) y/o meningoencefalitis (Atías, 1998).

Trascurridas algunas semanas, posterior al período agudo, con o sin la existencia de manifestaciones clínicas, la multiplicación intracelular de los parásitos se vuelve lenta y disminuye la parasitemia, entrando en una fase latente, sin signos clínicos, la cual puede persistir en forma indefinida o desarrollar manifestaciones propias de la enfermedad de Chagas crónica, como son las secuelas (Atías, 1998; Prata, 1990; Tanowitz *et al.*, 1992).

El periodo crónico se caracteriza por una escasa parasitemia (Castro *et al.*, 1999) y un daño irreversible de algunos parénquimas, pudiendo evolucionar hacia noxas cardíacas, digestivas o neurológicas (Acquatella, 1998; Pays, 1999; Silva *et al.*, 1999). La miocardiopatía crónica y las alteraciones del ritmo cardiaco, son las formas más habituales

de la cardiopatía chagásica (Añez *et al.*, 1999). La patogenicidad siempre comienza en el periodo subclínico, con aparición de alteraciones electrocardiográficas, caracterizadas por bloqueo completo de la rama derecha del haz de Hiss y hemibloqueo izquierdo anterior. Esto puede continuar por largo tiempo o volverse sintomático. Los síntomas más frecuentes son: palpitaciones, mareos, síncope, disnea de esfuerzo, edema y dolor precordial en la forma adquirida por acción del vector (Berra *et al.*, 1998).

En relación a la patogenia de la cardiopatía crónica, ésta es multifactorial, ya que involucra una pérdida del control autónomo del corazón, por la destrucción selectiva de las neuronas parasimpáticas, predominando la inervación simpática, lo que conduce a las células cardíacas a su hipersensibilidad a las catecolaminas (Gavin *et al.*, 1998) y a la destrucción directa del tejido cardíaco por el *T. cruzi*. La ruptura de los nidos de amastigotos lleva a una reacción inflamatoria y fibrosis, y a reacciones inmunes anti-miocardio por mediación celular y/o humoral (Kierszenbaum, 1999; Rosse, 1998).

Dependiendo de la progresión y magnitud del daño cardíaco, pueden aparecer arritmias, hipertrofia y posterior dilatación del músculo cardíaco (cardiomegalia), insuficiencia cardíaca en forma progresiva y fenómenos de tromboembolismo entre otras complicaciones (De Oliveira *et al.*, 1998). La fibrilación ventricular es probablemente la causa más frecuente de muerte súbita en los pacientes chagásicos crónicos (Atías, 1998).

Por otro lado, una fracción no determinada de enfermos desarrolla trastornos del tubo digestivo, pudiendo ser afectada cualquier porción de éste. Sin embargo, los tejidos más comúnmente afectados son el esófago y el colon (De Oliveira *et al.*, 1998). Se producen trastornos de la motilidad esofágica, el tránsito intestinal se ve retardado, provocando una disfagia lórica, dolor epigástrico y regurgitación, apareciendo finalmente el fenómeno de acalasia, que posteriormente con el aumento del calibre y dilatación del órgano, lleva al desarrollo del megaesófago (Rezende y Moreida, 1988).

En el colon se producen alteraciones peristálticas, manifestándose por constipación progresiva, fecalomas, dilatación y elongación (dolico megacolon), constituyéndose el megacolon chagásico y pudiendo complicarse con vólvulos intestinales agudos. La dilatación de los segmentos digestivos se debe a una degeneración de las neuronas de los plexos mientéricos frecuentemente acompañada de la infiltración de linfocitos e histocitos.

No obstante, esta degeneración comienza en la fase aguda, pero la aparición de los megasíndromes, se observan generalmente en el adulto, donde la pérdida fisiológica progresiva de las neuronas en los plexos ya dañados alcanza un nivel crítico. (Atías, 1998; De Oliveira *et al.*, 1998)

La neuropatía chagásica representa la destrucción neuronal que afecta los sistemas nerviosos central, periférico y autónomo, que según la localización de la lesión, puede evidenciarse la aparición de parestias, perturbación funcional del cerebelo, convulsiones y anomalías psíquicas (Silva *et al.*, 1999).

Esta zoonosis parasitaria además de la transmisión vectorial también presenta otros mecanismos de infección. Con las migraciones de las poblaciones rurales hacia las grandes ciudades, el parásito pasó a ser transmitido mediante transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorios, constituyéndose actualmente, una forma de urbanización de la enfermedad (Solari y Spotorno, 2002). Además de estas formas adquiridas de la enfermedad de Chagas, existe la posibilidad de que los tripomastigotos de *T. cruzi* circulantes, presentes en una embarazada chagásica puedan ser transmitidos durante la gestación al feto, constituyéndose así, la forma transplacentaria de la enfermedad.

La importancia de la infección transplacentaria por *T. cruzi* en nuestro medio ha sido claramente establecida (Anon, 2000; Muñoz *et al.*, 1992; Schenone *et al.*, 1985.), pero aún persisten algunos problemas especialmente en su diagnóstico, lo que hace indispensable mejorar la calidad, sensibilidad y especificidad de la tecnología establecida hasta la fecha. Este tipo de transmisión es producida por el paso de los tripomastigotos de *T. cruzi* a través de la placenta, desde una madre infectada al feto en formación. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en Latinoamérica, oscila entre 50% en Bolivia y 8% en Uruguay (Muñoz *et al.*, 1992). En Chile diversos autores describen prevalencias entre 1% y 10% pero en algunas localidades de la III y IV Región esta cifra puede alcanzar al 20% de las mujeres en edad fértil (Muñoz *et al.*, 1992; Lorca, *et al.*, 1987). A diferencia de la toxoplasmosis, la transmisión del parásito al feto puede producirse en cualquier etapa de la infección materna, ya sea aguda o crónica; además puede repetirse en embarazos sucesivos e inclusive afectar en embarazos gemelares a ambos fetos (Muñoz y Thiermann, 1990).

Puede producir fetopatías y aborto, o al nacer el niño puede presentar una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde casos asintomáticos y aparentemente sanos hasta cuadros graves y mortales. Es así como en alrededor del 80%, la madre no transmite la infección al niño y éste nace absolutamente sano. Pero en una cifra que oscila entre 10 a 20%, se produce el paso del parásito a través de la placenta. De acuerdo al tiempo en que éste se produzca puede producir un mortinato, o el nacimiento de un niño infectado asintomático, o uno sintomático. En dichos casos la infección será persistente y de acuerdo a las conductas médicas que se apliquen, el niño evolucionará a la recuperación, enfermedad, secuelas o eventualmente la muerte (Freilij y Altchek, 1995).

Diversos estudios materno infantiles se han realizados en Chile en zonas de alta y baja endemia chagásica. Hasta la fecha, la única diferencia claramente establecida es que en las zonas de alta endemia, la prevalencia entre la embarazada puede oscilar entre 2,4% a 26,5% y en las zonas de baja endemia, entre 1 y 2% pero en ambas áreas la transmisión alcanza entre 10% y un 12,5% (Muñoz *et al.*, 1992; Schenone *et al.*, 1985). Los niños al nacer son asintomáticos en el 80% de los casos, de término y con adecuado peso de nacimiento. Cuando son sintomáticos, pueden presentar: prematuridad, bajo peso de nacimiento, ictericia, anemia, hepato y/o esplenomegalia, meningoencefalitis, miocarditis y en ocasiones compromiso ocular y muerte (Freilij y Altchek, 1995).

2.3.3. Diagnóstico

Diagnóstico en la etapa aguda y crónica

Además de los antecedentes clínicos y epidemiológicos, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas actualmente se basa en dos tipos de metodologías, una directa o de certeza y otra indirecta o serológica (Atías, 1998).

a) Métodos Directos:

Están orientados a la observación directa del *T. cruzi* en sangre de pacientes o en deyecciones de *T. infestans* y son útiles en etapa aguda de la enfermedad. Las técnicas más utilizadas son: examen directo de sangre fresca y gota gruesa, métodos de concentración como el microstrout y xenodiagnóstico, este último, útil también en la etapa crónica de la

enfermedad. La ventaja que presentan estos exámenes a excepción del xenodiagnóstico, es su bajo costo, fácil manejo, rapidez diagnóstica y una especificidad del 100%. Por el contrario la desventaja está dada por la sensibilidad que en algunos casos alcanza un 60% y en los crónicos sólo de un 20%, además de que las parasitemias detectadas se encuentran entre niveles medios a alto (Atías, 1998).

El xenodiagnóstico que utiliza al propio vector de la enfermedad, en la detección del *T. cruzi* en pacientes en etapa aguda o crónica de la enfermedad de Chagas, presenta por un lado ventajas de especificidad del 100%, sensibilidad en casos agudos del 80%, pero por otro lado, un costo más alto, manejo de personal semiespecializado, escasa rapidez diagnóstica, ya que sólo se pueden obtener resultados entre los 30 a 90 días, además que la sensibilidad en casos crónicos sólo alcanza al 40% y las parasitemias detectadas se encuentran entre niveles medio a alto (Atías, 1998; Solari *et al.*, 1998; Ferreira y Avila, 1995).

Diversos estudios demuestran que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizada en vectores, animales domésticos y silvestres y en pacientes agudos o crónicos con enfermedad de Chagas (Britto, *et al.*, 1995), presenta un alto grado de especificidad y sensibilidad, superando a los otros métodos directos en general (Juanqueira, *et al.*, 1996).

b) Métodos Indirectos:

Están orientados a la detección de anticuerpos específicos anti *T. cruzi*, por lo tanto evalúan la respuesta inmune humoral del hospedero infectado. Las técnicas convencionales más utilizadas, debido a su alta sensibilidad y especificidad, son la reacción de ELISA y la reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI); en ambos se pueden detectar y cuantificar inmunoglobulinas isotipo-específicas, como IgM, IgG e IgA. Su costo es medio y posee una rapidez diagnóstica de 24 hrs. y especificidad que oscila entre 98 y 100%. En cuanto a la sensibilidad, ésta va a depender de la fase de la enfermedad y la inmunoglobulina estudiada. En el período crónico, la IgG alcanza entre 95 – 100% y en el período agudo su utilidad es mínima, cobrando importancia la IgM que puede llegar a 60% de sensibilidad (Ferreira y Avila, 1995).

La utilización de técnicas no convencionales como los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, han permitido mejorar la sensibilidad en los casos agudos. Pero por su

alto costo, requerimiento de personal e infraestructura especializada, dificulta su utilización masiva (Lorca *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1991).

2.3.4. Tratamiento.

Actualmente se cuenta con dos medicamentos que han demostrado ser útiles en el tratamiento de la enfermedad, el Nifurtimox y el Benznidazol.

El nifurtimox es un derivado de los nitrofuranos, con efecto tripanomicida contra las formas tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*. El mecanismo de acción se relaciona con la capacidad de producir radicales superóxidos libres que originan productos parcialmente reducidos y que tienen acción tóxica a nivel celular, entre los que destacan radicales superóxidos, hidroxilo y peróxidos de hidrógeno, siendo este último el más dañino, pues el *T. cruzi* carece de catalasas y glutatión peroxidasa, haciéndolo más vulnerable a su acción. En el caso de los tripomastigotos, se inhibe la penetración a las células de los hospederos. *In Vitro* se ha observado un daño directo en los amastigotes intracelulares impidiendo su desarrollo posterior (Webster, 1987).

Clínicamente el efecto se traduce en una disminución de las parasitemias que caracterizan la fase aguda; sin embargo, en las formas crónicas su rendimiento es muy bajo (Urbina, 1999). En general, la serología persiste positiva, negativizándose los exámenes directos entre 80 a 100%, dependiendo del tiempo de seguimiento al que sean sometidos los pacientes (Freilij y Altcheh, 1998). Cuando existe daño tisular o las lesiones son irreversibles, el medicamento no tiene ningún efecto sobre éstos.

El Benznidazol, derivado nitroimidazólico, también es capaz de generar radicales libres intracelulares siendo, al igual que el Nifurtimox, un tripanomicida efectivo en las fases agudas de la enfermedad (Webster, 1987).

En términos generales el tratamiento de la enfermedad de Chagas ha demostrado ser efectivo en las primeras semanas de una infección vectorial, en la infección transfusional reciente, en los primeros estados de una reactivación y en los casos de infección transplacentaria.

En los casos de infección transplacentaria en nuestro país, el tratamiento se efectúa con Nifurtimox, que posee menos reacciones adversas y mejor tolerancia respecto al

Benznidazol. El tratamiento se inicia con dosis progresivas hasta alcanzar la recomendada entre 8 a 10 mg/kg/día durante 60 días, vía oral. La efectividad dependerá en gran medida del período de la infección y de la prontitud con que se instaure el tratamiento una vez confirmado el diagnóstico

2.4. Criterios De Identificación.

El *T. cruzi* constituye una compleja población de parásitos tanto en mamíferos domésticos o silvestres, como en el insecto vector. Cuando se estudian las cepas aisladas de estos diversos hospederos, se observa una gran variedad tanto en la morfología, virulencia y en la distinta susceptibilidad a los agentes quimioterápicos, más que cuando se las estudia en modelos experimentales (Solari *et al.*, 1998).

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

Ha sido de creciente interés la caracterización bioquímica e isoenzimática de las cepas de *T. cruzi*. Así la electroforesis isoenzimática, un método que detecta las diferencias entre enzimas que presenta propiedades catalíticas comunes, pero que tienen estructuras moleculares diferentes, han permitido caracterizar las poblaciones de *T. cruzi* en relación con su perfil bioquímico; es decir, con sus zimodemas. De esta forma, se ha determinado que en Brasil el zimodema 1 (Z1) es característico de las cepas de animales silvestres y de los triatomas, mientras que Z2 se encuentra en las cepas del hombre y de los animales domésticos. En Chile se ha observado Z1, aislado principalmente de *M. spinolai* y de animales silvestres de las regiones III al sur, mientras que también se encuentra en *T. infestans* de la I y II regiones. En cambio, Z2 se ha obtenido de *T. infestans*, del hombre y de animales domésticos de todo el país. El zimodema Z2 se ha dividido en Z2a, similar a Z2 de Brasil, y Z2b de Bolivia, el cual es el más prevalente en Chile. En Venezuela la mayoría de las cepas aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas es de Z1. Por otra parte, en el este de Brasil predomina Z2. El estudio de estos marcadores isoenzimáticos permitirá conocer mejor los ciclos domésticos y silvestres del *T. cruzi* (Brisse *et al.*, 2000; Tibayrenc, 1998).

Diferentes estudios han demostrado la variabilidad isoenzimática de cepas de *T. cruzi*, aisladas de diversos hospederos (Miles, 1980; Romanha, 1979). A partir de estos resultados se llegó a la conclusión de que la multiplicación del parásito es asexual, lo que genera una serie de poblaciones o clones naturales, que exhiben considerables diferencias genéticas (Ayala, 1993). Esta estructura clonal tendría un gran impacto sobre las propiedades biológicas del parásito (Revollo *et al.*, 1998; Tibayrenc, 1995).

El estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* permite la identificación de las cepas principales y secundarias presentes en los vectores, evaluación de la relación entre los ciclos silvestres y domésticos, identificación de los reservorios, relación con la endemidad y rol en la patología humana.

Los análisis comparativos de varios marcadores polimórficos muestran una alta correlación con los diferentes zimodemas identificados (Tibayrenc *et al.*, 1998), además los genotipos más frecuentes presentan una distribución geográfica muy extensa, lo cual concuerda con la reproducción clonal (Tibayrenc, 1995).

El análisis isoenzimático permite estudiar el modo de reproducción de los organismos, medir las distancias evolutivas y construir árboles filogenéticos. El taxón *T. cruzi* se caracteriza por un grupo de clones distribuidos sobre largas áreas geográficas con algunos clones más frecuentes llamados clones mayores -Clados- (Tibayrenc, 1995; Tibayrenc, 1998). EL número de clones identificados en el taxón *T. cruzi* no es limitado, el incremento de las cepas estudiadas y la resolución de las técnicas utilizadas para el estudio del genoma permiten detectar mayor variabilidad genética; sin embargo, datos isoenzimáticos y análisis por RAPD de varias cepas representativas de la diversidad del taxón, además de análisis de genes de mini-exón y del RNA ribosomal 24S, mostraron que las poblaciones de *T. cruzi* se reparten en dos principales linajes, cada uno muy polimórfico, denominado **Linaje 1** y **Linaje 2** (Souto *et al.*, 1996), o “clado” o filum, llamados 2^{do} filum mayor y 1^{er} filum mayor respectivamente (Tibayrenc, 1995; Brisse *et al.*, 1998).

Las cepas previamente descritas por Miles *et al* en 1980 como Z1, pertenecen al primer filum mayor y las cepas nombradas Z2 y Z3 se encuentran dentro del segundo filum mayor respectivamente (Tibayrenc, 1995; Brisse *et al.*, 1998).

Durante el simposio internacional en conmemoración del 90^{mo} aniversario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, realizado en abril de 1999 en Rio de Janeiro, Brasil, se realizó una reunión satelital sobre recomendaciones de estandarización de la nomenclatura de *T. cruzi*. Dentro de ellas se destaca la designación o calificación de cepas como ***T. cruzi* 1 (Tc I)** aquellas equivalentes al Zimodema 1 (Miles, 1980; Barret *et al.*, 1980), Type III (Andrade, 1974), Linaje 2 (Souto *et al.*, 1996), Grupo I (Tibayrenc, 1995), Ribodema II/III (Clark y Pung, 1994), 1er filum mayor (Tibayrenc, 1998), o similares; y como ***T. cruzi* II (Tc II)** a aquellas equivalentes al Zimodema 2 (Miles, 1980; Barret *et al.*, 1980), Zimodema A (Romanha, 1979), Type II (Andrade, 1974), Linaje 1 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 2 (Tibayrenc, 1995), Ribodema I (Clark y Pung, 1994), 2^{do} filum mayor (Tibayrenc, 1998), o similares.

Estos estudios han demostrados la existencia de distintas poblaciones clonales, actualmente por medio de técnicas moleculares, se ha establecido que algunos genotipos tienen mayor afinidad por ciertos tejidos u órganos, lo que explicaría la diversidad de manifestaciones clínicas en los individuos con enfermedad de Chagas. (Revollo *et al.*, 1998). Por otra parte, no existen antecedentes claros que demuestren cuáles son los factores involucrados en la transmisión de la infección, ni tampoco la existencia de diferencias genéticas a nivel parasitario, que implicarían que ciertas poblaciones de *T. cruzi* tendrían mayor facilidad de atravesar la placenta, y así infectar al feto en formación.

De acuerdo a estos antecedentes, se requiere mejorar el diagnóstico precoz de la infección por *T. cruzi*, contar con mejores herramientas para la evaluación del tratamiento de la infección, estudiar las características genéticas del parásito y asociarlas con los antecedentes epidemiológicos de las cepas involucradas en la infección y asociarlas con los procesos que pudieran estar involucrados en la patología y evolución de la infección.

Por tal motivo, la técnica de biología molecular denominada PCR representa una herramienta altamente sensible y específica que reúne todas las características necesarias para su utilización y aplicación en el diagnóstico parasitológico.

2.5. Estudios Filogenéticos.

Durante siglos los científicos han intentado evaluar y describir la diversidad biológica, así como explicar los patrones y procesos por los cuales se origina. Esta disciplina es conocida como sistemática y tiene dos niveles de estudio: el análisis de las relaciones filogenéticas o de parentesco entre los taxa y el estudio de los procesos evolutivos que ocurren en las distintas poblaciones de una especie. Conocer las relaciones filogenéticas de un grupo es importante, no sólo para que el sistema de clasificación refleje la estructura histórico jerárquica del mismo, sino porque es relevante para otras áreas de la biología como la fisiología, ecología, epidemiología o biología de la conservación. Entre todas las herramientas moleculares desarrolladas hasta hoy, la secuenciación de fragmentos de DNA, ha permitido la comparación nucleotídica de genes específicos con fines sistemáticos. Particularmente en este tipo de estudios, el DNA mitocondrial ha recibido mayor atención que el DNA nuclear, debido a que puede ser aislado junto con el DNA genómico, se presenta en alto número de copias por célula, y presenta una organización de secuencias simple, resultado ideal para la reconstrucción de filogenias, siendo el citocromo *b* uno de los genes más estudiados (Marín, 2004).

2.5.1. Criterios para análisis filogenéticos.

Después de haberse separado cladísticamente, dos linajes pueden adquirir independientemente nuevas similitudes por acción de factores evolutivos que no son herencia de un ancestro común, lo que se denomina evolución paralela (Spotorno *et al.*, 2004a). Incluso después de estar separadas muchos millones de años, dos especies de parentesco muy remoto pueden adaptarse a condiciones que hacen sugerir nuevas y muy particulares similitudes (evolución convergente). Como es difícil separar estas similitudes se las junta en una sola categoría: homoplasia (Spotorno, 1984). De lo anterior, surge la necesidad de criterios para distinguir los varios tipos de similitudes. Sólo aquellas homologías debidas a un ancestro común cercano, llamadas técnicamente sinapomorfías, constituyen buenos argumentos para unir cladísticamente dos taxones; estas sinapomorfías son las que permiten reconstituir la filogenia verdadera que se intenta estimar.

En las últimas décadas han aparecido criterios definidos para reconocer homologías verdaderas, en contraste con las homoplasias. Estos criterios son:

▪ **Criterios mayores:**

a) Relación o criterio de posición: Las entidades homólogas ocupan posiciones similares en los sistemas;

b) Relación o criterio de composición: Las entidades homólogas están compuestas de partes similares en número, forma o función, y en sus interrelaciones mutuas.

Extensión de los criterios mayores:

Relación o criterio de serie: Las entidades homólogas pueden ser ordenadas en una serie, de manera que los extremos pueden ser conectados por pasos intermedios.

▪ **Criterios menores o subsidiarios:**

a) Las homologías son probables en entidades aparentemente similares en posición y composición y que aparecen en especies que, por los criterios mayores, ya se sabe que poseen homologías.

b) Las homologías son probables cuando entidades similares ocurren en gran número de especies.

c) La posibilidad de homología existe si un conjunto de entidades similares se distribuyen de manera similar en varias especies. Esta posibilidad aumenta con la adición de tales conjuntos (Spotorno *et al.*, 2004a).

Los caracteres homoplásicos no resisten el análisis detallado que indican estos criterios. Las similitudes empiezan a desaparecer a medida que el análisis se hace más fino, y más lejano se hace el nivel donde se observaron las similitudes homoplásicas (Spotorno *et al.*, 2004b).

2.5.2. Filogenia de Trypanosomas.

Hay una reciente revisión respecto a la evolución molecular de los *Trypanosomas*, basadas en secuencias de RNA ribosomal (rRNA) que indican origen en África y parafilia para *Trypanosoma*, aunque otros genes indican monofilia. Hay claramente una escasa representación del material chileno; es así como una búsqueda en GenBank del género arrojó 122.348 entradas, para citocromo b hay solo 3 secuencias chilenas ingresadas: *T. cruzi* cepa Tulahuen c12 (AJ130936), la cepa CBB y la cepa MN.cl2, las tres pertenecientes a la IV Región del país, correspondiendo a un trabajo realizado por el grupo Tibayrenc en Francia (Brisse *et al.*, 2000). En total hay solo 21 secuencias publicadas para el gen de citocromo *b* en este grupo.

El análisis del *T. cruzi* mediante PCR entrega información rápida sobre el o los genotipos presente en una determinada muestra biológica. Este enfoque ha sido utilizado en Bolivia y Brasil para obtener información sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas. En Chile el primer y único resultado con este análisis se obtuvo con muestras de pacientes chagásicos (Solari y Spotorno, 2002). Resulta por ende necesario acumular información sobre la variabilidad de *T. cruzi* circulantes en el ciclo selvático de la transmisión de la enfermedad de Chagas.

III OBJETIVOS

- **Objetivo general.**

Desarrollar una descripción de la diversidad molecular de las poblaciones de *T. cruzi* circulando en territorio chileno a partir de muestras obtenidas de mamíferos hospederos y sus insectos vectores, como también reconstruir su filogenia usando la secuencias del gen para citocromo *b*.

- **Objetivos específicos.**

- Identificación y descripción molecular de cepas de *T. cruzi*, tanto de ciclo silvestre como peridomiciliario, mediante secuenciación del gen para citocromo *b*.
- Caracterizar y comparar la variación genética de estas secuencias en las distintas cepas que forman parte de los ciclos silvestres y peridomiciliarios de la enfermedad de Chagas.
- Analizar filogenéticamente estas secuencias nuevas.

IV MATERIAL Y MÉTODO.

4.1. Muestras analizadas.

Las secuencias del gen para la proteína citocromo b fueron obtenidas a partir del análisis de un stock total de 60 muestras de la I y IV Región (las muestras de cabra, degu y yaca provienen de la Reserva Nacional Las Chinchillas, Aucó, IV Región) (Cuadro N°: 1). De este conjunto de muestras fueron finalmente secuenciadas y analizadas un total de 9, correspondiendo 3 de éstas a cabra (*Capra hircus*), dos a degu (*Octodon degus*), una al parásito vector *T. infestans*, una a *M. spinolai* y dos cepas de referencia que pertenecen a muestras procedentes de Humanos como son las las cepas SAP6 y la cepa CBB Tulahuen-human. (Ochs *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2000), única cepa de este estudio que se encuentra publicada en Gen Bank para citocromo b de *T. cruzi*. Todas las secuencias obtenidas en el presente estudio son originarias de la IV Región. Este conjunto de cepas secuenciadas fueron analizadas junto a la totalidad de cepas publicadas disponibles para citocromo b de *T. cruzi* en GenBank, correspondiendo a un total de 21 cepas, de las cuales sólo 3 son originarias de Chile, todas estas procedentes de la IV Región (Cuadro N°: 2) El stock disponible en Gen Bank, alcanzadas en su totalidad a través de cultivos celulares, es un grupo muy heterogéneo en cuanto al país de origen, localidad y hospedador originario, lo cual nos entrega una adecuada base de comparación.

Especie de origen	Cantidad	localidad
<i>Capra hircus</i> (Cabra) ♦(3)	14	IV Región (Aucó)
<i>Octodon degus</i> (Degu) ♦(2)	12	IV Región (Aucó)
<i>Thylamis elegans</i> (Yaca)	3	IV Región (Aucó)
<i>Phyllotis darwini</i>	10	I Región
<i>Abrothrix olivaceus</i> (Laucha olivácea)	10	I Región
<i>T. infestans</i> (Vinchuca) ♦(1)	5	IV Región
<i>M. spinolai</i> ♦(1)	4	IV Región
Humano ♦(2)	2	IV Región
Total	60	

Cuadro 1: Origen y número de muestras analizadas.

♦(N°): Muestras secuenciadas y analizadas filogenéticamente.

Cepa	Linaje	País	Localidad	Hospedador
133-79 cl7	<i>T. cruzi</i> I	Bolivia	Santa Cruz	Humano
Cuica cl1	<i>T. cruzi</i> I	Brasil	Sao Paulo	<i>Philander opossum</i>
X10 cl1	<i>T. cruzi</i> I	Brasil	Belém	Humano
SC13	<i>T. cruzi</i> I	Colombia	Antioquia	<i>Rhodnius pallescens</i>
Tehuantepec cl2	<i>T. cruzi</i> I	México	Tehuantepec	Humano
CanIII cl1	<i>T. cruzi</i> IIa	Brasil	Belém	Humano
Stc33R	<i>T. cruzi</i> IIa	USA	St. Catherines Island	<i>Procyon lotor</i>
DogT	<i>T. cruzi</i> IIa	USA	Oklahoma	<i>Canis familiaris</i>
CBB cl3	<i>T. cruzi</i> IIb	Chile	Tulahuén IV Región	Humano
Esmeraldo cl3	<i>T. cruzi</i> IIb	Brasil	Bahia	Humano
TU18 cl2	<i>T. cruzi</i> IIb	Bolivia	Tupiza	<i>Triatoma infestans</i>
M6241 cl6	<i>T. cruzi</i> IIc	Brasil	Belém	Humano
M5631 cl5	<i>T. cruzi</i> IIc	Brasil	Marajo	<i>Dasybus novemcinctus</i>
X109/2	<i>T. cruzi</i> IIc	Paraguay	Makthlawaiya	<i>Canis familiaris</i>
MN cl2	<i>T. cruzi</i> IId	Chile	IV Región	Humano
SC43 cl1	<i>T. cruzi</i> IId	Bolivia	Santa Cruz	<i>Triatoma infestans</i>
CL Brener	<i>T. cruzi</i> IIe	Brasil	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>
Tulahuen cl2	<i>T. cruzi</i> IIe	Chile	IV Región	Humano
Guateque	<i>T. cruzi</i> IIe	Colombia	Guateque Bocaya	<i>Rhodnius prolixus</i>
X57/3	<i>T. cruzi</i> IIe	Paraguay	Makthlawaiya	<i>Canis familiaris</i>
M1117	<i>T. cruzi marinkellei</i>	Brasil	Para	<i>Phyllostomum hastatus</i>

Cuadro 2: El stock disponible en GenBank para citocromo *b* de *T. cruzi* correspondiendo a un total de 21 cepas, de las cuales solo 3 son originarias de Chile, todas de la IV Región. Se muestra el nombre publicado de la cepa, su clasificación internacional, país, localidad de origen y el hospedero del cual se obtuvo.

El conjunto de muestras en estudio fue proporcionado por el laboratorio de Ciencias Biológicas del ICBM, provistas por el doctor Aldo Solari. En este lugar se realizó el proceso de extracción del DNA a partir de la muestras de sangre y tejidos en el caso de los mamíferos, y desde la heces de los vectores *T. infestans* y *M. spinolai* infectados. Las muestras fueron calificadas como positivas por el *T. cruzi* mediante la técnica PCR (Saiki *et al.*, 1985).

4.2. Amplificación de DNA a partir de la técnica PCR.

4.2.1- Diseño de partidores

El DNA de las muestras en estudio se amplificó mediante “La Reacción en Cadena de la Polimerasa” PCR (Saiki *et al.*, 1985), con la obtención de una banda de 700 pares de bases, que corresponde a la secuencia del gen para citocromo b de *T. cruzi*. Para dicho objetivo se utilizaron dos partidores diseñados en base a la secuencia del fragmento 5736-NT TRCKPMAX desde la cepa Tulahuen de *T. cruzi* (Ochs *et al.*, 1996), obtenida en GenBank, los partidores **P18** y **P20** (Cuadro N° 3)

Nombre del partidor	Secuencia nucleotídica	Temperatura de alineamiento	Dirección en el gen
P18	⁵ GACAGGATTGAGAAGGGAGAGAG ³	60° C	Sentido
P20	⁵ CAAACCTATCACAAAAGCATCTG ³	58° C	Anti-Sentido

Cuadro 3: Secuencias de oligonucleótidos usados como partidor para la amplificación y secuenciación del gen para citocromo *b*. Se muestra la secuencia de cada partidor y la dirección de amplificación en el gen.

4.2.2.- Amplificación del gen para citocromo b de *T. cruzi*.

El DNA mitocondrial aislado desde muestras de animales e insectos infectados fueron amplificados por PCR con partidores conservados del gen para citocromo *b* (P-18 y P-20). Se realizó amplificación por PCR de un fragmento de 700 pares de bases. La amplificación se llevó a cabo en una reacción de 50µl que contenía: 25pmoles de cada oligonucleótido, que fue usado como cebador, 1U de Taq DNA Polimerasa, el Tampón suministrado con la enzima (KCl 50mM; Tris-Cl mM; Tritón X-100 0,1%; MgCl₂ 2,5mM), los cuatro desoxinucleótidos (200 mM cada uno), agua destilada estéril y entre 3 y 6 µl de cada muestra. La mezcla fue amplificada en un termociclador Perkin-Elmer en 35 ciclos de

45 segundos de desnaturalación a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 58°C y 45 segundos de extensión a 72°C. El programa se inició con una partida en caliente a 94°C por 10 minutos y se concluyó con una extensión final de 7 minutos a 72°C.(Figura N° 6)

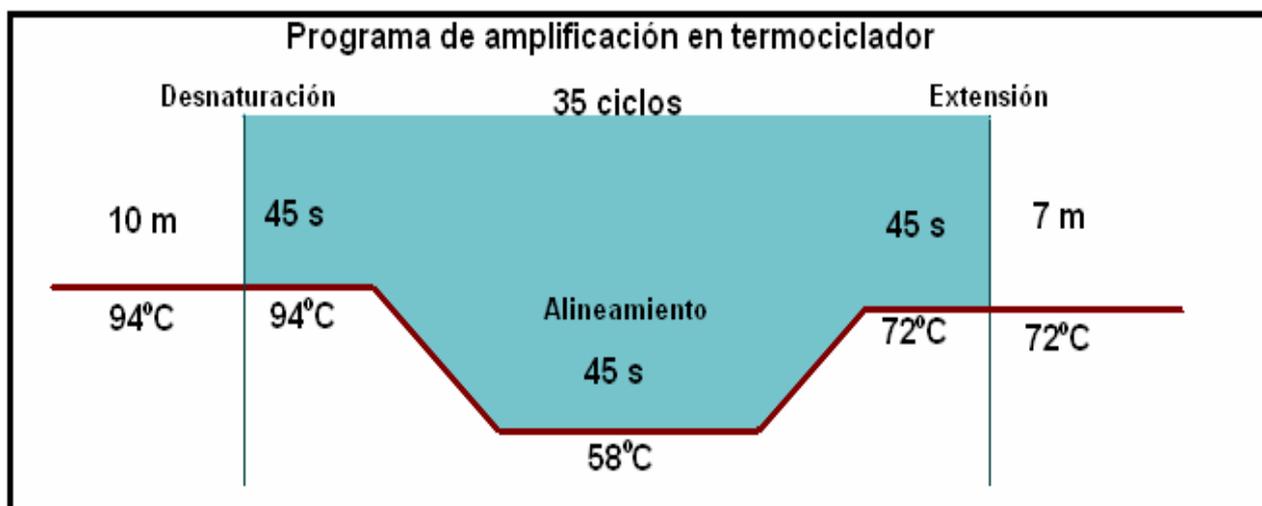


Figura 6: Gráfico del programa de amplificación del termociclador donde se muestra la temperatura y el tiempo de desnaturalación, alineamiento y extensión.

4.3.- Análisis y Purificación de los fragmentos amplificados

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en electroforesis de gel de agarosa 1,2% en tampón TBE 1% (Figura N°7). Como estándar de tamaño molecular se utilizó marcador “ladder” de 100pb con marca de 500pb (GIBCO-BRL). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 volts por aproximadamente 2 horas.

La Fluorescencia emitida al teñir el gel con bromuro de etidio se observó en un transiluminador UV. El DNA amplificado fue purificado directamente o a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, utilizando kits comerciales (QIA quick Spin Handbook® PCR Purification) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron secuenciadas en secuenciador automático de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

4.4.- Análisis de las secuencias del gen para citocromo *b*.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL-X y MEGA 4, luego revisadas manualmente con los electroferogramas en dirección reversa y directa de cada fragmento, utilizando como secuencia de referencia la cepa Tulahuen c12 human (AJ130936) (Brisse *et al.*, 2000). El porcentaje de nucleótidos totales y por posición de codón, el número de Transiciones (ts), el número de transversiones (tv) y las razones de estas (ts/tv), se calcularon con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Kumar *et al.*, 2004).

4.5.- Análisis filogenético de las cepas secuenciadas a partir del gen para citocromo *b*.

Las relaciones filogenéticas fueron investigadas a partir de una matriz de estados de carácter, en donde cada posición nucleotídica representa un carácter y las cuatro bases los cuatro estados posibles. El análisis de las relaciones filogenéticas fue realizado con criterios de Máxima Parsimonia, Máxima verosimilitud o probabilidad (“Maximum Likelihood”) y Distancia incluidos en los programas MEGA 4 y PAUP 4.0. Los caracteres fueron especificados como no ordenados, los intervalos en las secuencias en que no se pudo obtener el carácter fueron tratados como extraviados (“Missing”), los intervalos, deleciones o inserciones se trataron como nuevos estados de carácter. Para la polarización de caracteres se utilizaron los grupos externos obtenidos de GenBank para citocromo *b* de *T. cruzi*.

La confiabilidad de los árboles obtenidos en los análisis de parsimonia y máxima verosimilitud, fueron puestos a prueba realizando 500 réplicas de “bootstrap”, método estadístico de remuestreo con reemplazo, implementado en el programa MEGA 4 y que deja colapsar las ramas que tengan menos de 50% de apoyo. Este procedimiento se realizó con el propósito de pesquisar el error de muestreo asociado al conjunto de datos.

4.5.1.- Máxima Parsimonia.

Utilizando el número total de OTUs (Operational Taxonomic Units) analizados, se realizó una búsqueda exhaustiva del árbol más corto considerando las tres posiciones del triplete y considerando sólo los caracteres en que se presenta un cambio filogenéticamente informativo (se entiende como carácter filogenéticamente informativo un carácter compartido por al menos dos de los taxos analizados, que favorece un árbol filogenético sobre otros.). Finalmente con las topologías así generadas, se confeccionaron árboles de consenso con el criterio de la regla mayoritaria que muestra nodos mayores a 50%, siendo este último método la vía más simple y eficiente de hipotetizar relaciones filogenéticas entre organismos en base a estados de carácter. La estimación de confianza para cada nodo se evaluó ejecutando remuestreo (“bootstrap”) de 500 réplicas, realizado a través de una búsqueda heurística (“Heuristic search”).

4.5.2.- Análisis de distancia.

A través del análisis de distancia, incluido en el programa MEGA 4 y PAUP 4.8b, se reconstruyó la historia filogenética de las cepas en estudio, usando el algoritmo de unión del vecino más próximo (“Neighbor-joining”) (Saitou y Nei, 1987) y la matriz de distancia de “Kimura-2-parámetros” (Kimura, 1980), que presume igual frecuencia para cada base, clasifica las diferencias entre dos o más secuencias como transiciones y transversiones y establece una ponderación diferente entre ellas (Page y Holmes, 1998). Este análisis fue aplicado al conjunto de la matriz sin ponderación, de manera que cada cambio de estado del carácter tenga el mismo peso. Se realizó el mismo tipo de análisis para una matriz en la que se excluyeron los cambios de carácter que no eran filogenéticamente informativos. Para dichas tipologías se realizó un análisis con “bootstrap” con 500 réplicas.

4.5.3.- Máxima Verosimilitud.

Para la búsqueda del árbol más verosímil, a través de una búsqueda heurística, se utilizó un modelo de Máxima Verosimilitud (“Maximum Likelihood”) incluido en programa PAUP 4.b8, que entrega un valor probabilístico expresado en el logaritmo natural de un número determinado de reordenamientos de los árboles posibles de generar con los caracteres disponibles. Este método probabilístico fue aplicado a las mismas cuatro matrices de datos analizadas con criterios de Máxima Parsimonia y Distancia.

V RESULTADOS.

5.1.- Amplificación de los fragmentos mediante la técnica PCR.

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en electroforesis de gel de agarosa 1,2% en tampón TBE 1%. Se observó la fluorescencia emitida al teñir el gel con bromuro de etidio a través de un transiluminador UV, los resultados positivos, en los cuales se apreciaba una banda de 700pb, se fotografiaron y registraron para posteriormente purificarlos utilizando kits comerciales (QIA quick Spin Handbook® PCR Purification) (Figura N° 7).

Las Muestras con resultados positivos que se lograron secuenciar, se detallan en el cuadro N° 4

F06 V195	<i>T. infestan</i>	IV Región
SAP6.18.	Humano	IV Región
5-P18	Cabra	IV Región
26T-P18	Cabra	IV Región
24T-P18	Cabra	IV Región
54-P18	<i>O. degus</i>	IV Región
58-P18	<i>O. degus</i>	IV Región
A04.F	<i>M. spinolai</i>	IV Región
CBB-P18	Humano	IV Región

Cuadro 4: Muestras amplificadas, purificadas y secuenciadas. Se especifica el nombre de la cepa, su hospedador y origen geográfico.

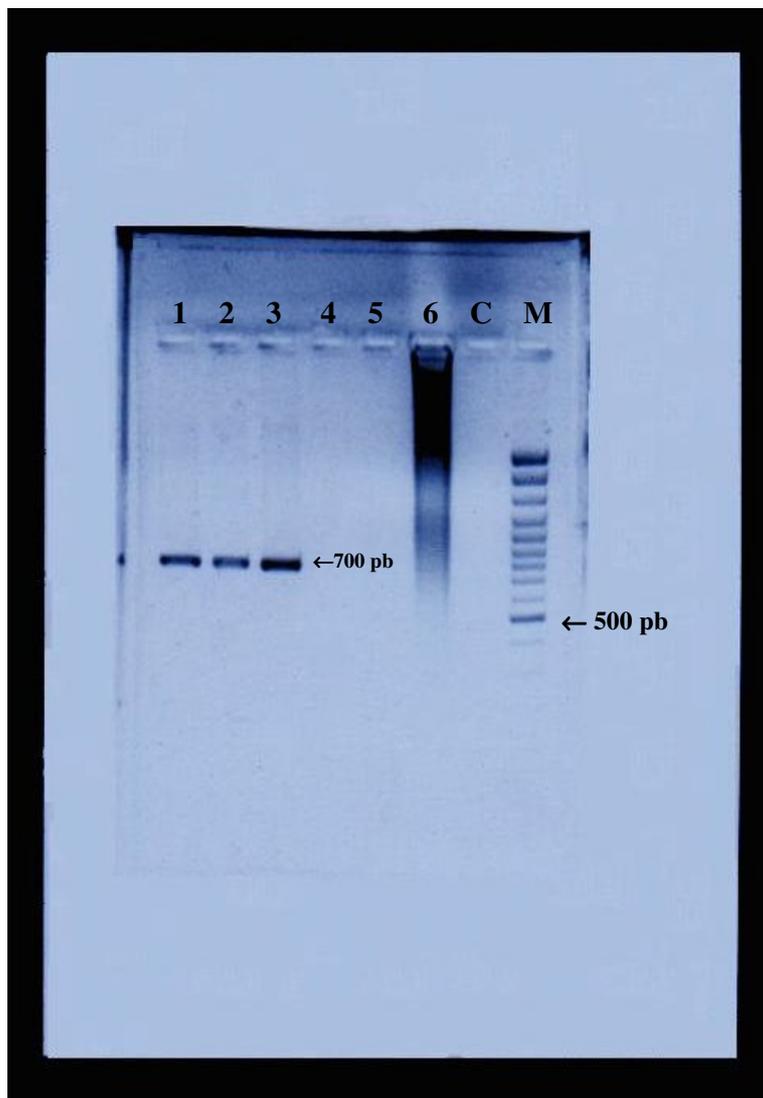


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1,2% en tampón TBE 1% fotografiada con fluorescencia de bromuro de etidio (negativo de la fotografía). Se observan las bandas de 700pb obtenidas en los carriles 1, 2, 3. (Muestras: F06.V195, SAP6 P18 y CBB P18 respectivamente). Los carriles 4, 5 y 6 se observan sin resultados positivos; en el carril 7 el control negativo (C) y en carril 8 marcador “ladder” de 100pb, con marca de 500pb.

5.2.- Análisis de las secuencias del citocromo b.

Las secuencias completas del gen para citocromo b (517 pb y 172 tripletes) obtenidas de 3 cabras, 2 de *O. degu*, 1 de *T. infestas*, 2 de humano y 1 de *M. spinolai* fueron alineadas y traducidas totalmente utilizando el programa MEGA 4.0 (Kumar et al., 2004), no encontrándose codones de términos entre los caracteres obtenidos, ni cambios en el marco de lectura en toda la secuencia. Considerando todos los taxa e incluyendo las secuencias obtenidas de GenBank (Brisse *et al.*, 2000), 363 caracteres se presentaron constantes y 153 sitios se presentaron variables. De entre los sitios variables, 87 correspondieron a caracteres filogenéticamente informativos. Cuando se consideran sólo las cepas secuenciadas en el laboratorio, la variación nucleotídica se reduce, presentando 397 caracteres constantes y 119 sitios se mostraron variables, de los cuales 37 son caracteres filogenéticamente informativos.

Por otra parte, resulta interesante observar que entre la siete cepas obtenidas de cabra y *O. degus* se encontraron 43 sitios nucleotídicos variables. Sin embargo al analizar estas secuencias junto a las otras cepas obtenidas en territorio chileno presentes en GenBank, la variación nucleotídica aumenta significativamente, presentando 118 caracteres variables siendo, 78 de estos filogenéticamente informativos.

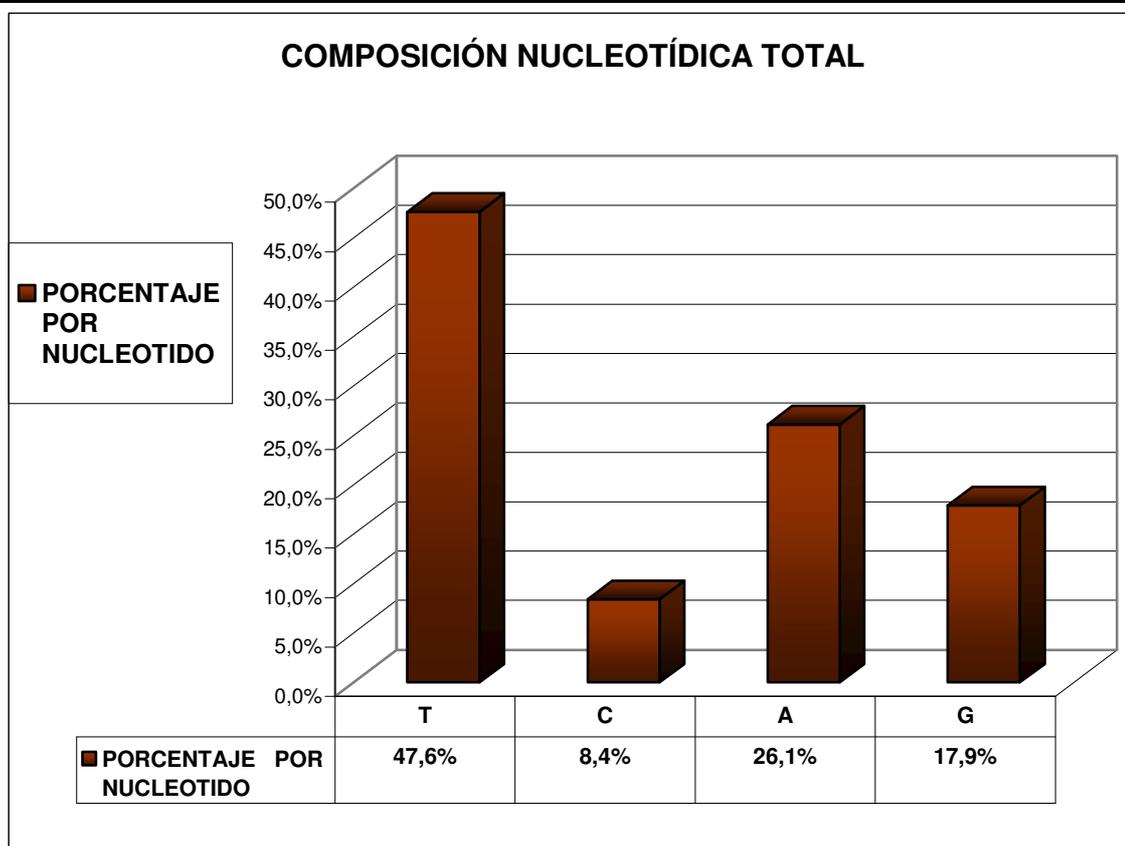
5.3.- Composición nucleotídica.

Al analizar las secuencias, considerando las tres posiciones de cada nucleótido en el triplete y los distintos taxas, la composición promedio de nucleótidos para la “hebra liviana”, incluyendo las secuencias obtenidas de GenBank (Brisse *et al.*, 2000), fue de 47.6% de timina, 8,4% de citosina, 26,1% de adenina y 17,9% de guanina (Gráfico N°1), constatándose un significativo déficit de citosina. Esta observación se acentuó en la primera posición del triplete de todos los taxa, donde se presentó sólo en un 6.1%.

La frecuencia de los cuatro nucleótidos difiere en relación con la posición en el triplete (Gráfico N°2). Tanto la primera posición como la tercera posición presentan frecuencias nucleotídicas similares para cada base, con un fuerte predominio del nucleótido Timina (45,4% y 47,3% para cada posición respectivamente), siguiendo en frecuencia la

base Adenina (31,2% y 31,6% respectivamente); en un menor número se observó Guanina (17,3% y 13,7%), siendo el nucleótido Citosina el que se encontró en menor proporción (6,1% y 7,4%). En la segunda posición del triplete, esta distribución cambió, presentándose con el nucleótido Timina aun más predominante (50,2%) seguido ahora de la base Guanina (22,7%) en desmedro de Adenina (15,4%), manteniéndose siempre Citosina en menor proporción (11,7%).

Gráfico 1: Composición nucleotídica total de las secuencias analizadas. Se destaca notoriamente la gran presencia del nucleótido timina por sobre los otros nucleótidos.



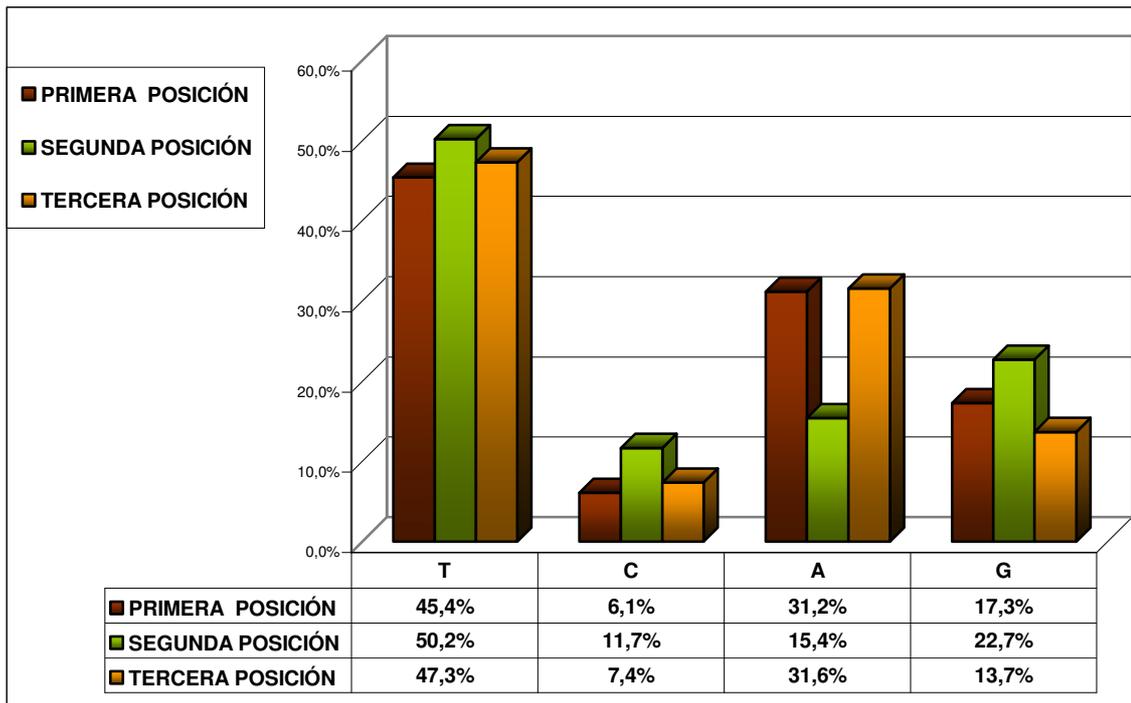


Gráfico 2: Composición nucleotídica total de las secuencias analizadas considerando cada posición del triplete

5.4.- Variabilidad de las secuencias.

Considerando el total de sitios variables (153), el 32,6%, 14,3%, y 53,6% de ellos correspondieron a la primera, segunda y tercera posición del triplete respectivamente. Esto nos indica que la tercera posición del triplete es más variable que las dos primeras, siendo la segunda posición del codón la más conservada. De los 172 aminoácidos, 57 fueron variables, correspondiendo 31 de estas sustituciones a cambios filogenéticamente informativos.

El promedio de la relación ts/tv (transiciones/transversiones) observada entre todos los taxa fue de $x = 3,375$ es decir, que por cada transversión existen 3,3 transiciones, encontrándose el valor mínimo de esta relación (0,60) entre las muestras obtenidas a partir de cabra y *O. degus*. En todos los taxa analizados la relación ts/tv fue mayor en la tercera

posición con un 5,4, seguido de la primera posición con una relación de 3,2 correspondiendo el valor mínimo de esta relación a la segunda posición (0,8).

La divergencia entre las secuencias de todos los taxa analizados (distancias corregidas a través de la opción “Kimura 2 parámetros” incluyendo las tres posiciones del codon) expresó un promedio total de 0.0690 por sitio de sustitución. Entre el grupo de cepas obtenidas de cabra, la divergencia promedio fue de 0,0466 con un rango de 0,0501-0,0439 por sitio de sustitución. Entre el grupo *O. degus* la divergencia promedio fué de 0,0357, y entre las cepas derivadas de parásitos vectores fue de 0,0506. Analizando la divergencia promedio entre el grupo de cabra y *O. degus*, ésta fué 0,0335, entre el grupo de cabra y vector parásito fué de 0,0615, mientras que entre el grupo *O. degus* y el grupo derivado del parásito vector, se observó un porcentaje de 0,0726. (Cuadro N° 4)

5.5.- Relaciones evolutivas.

5.5.1.- Máxima parsimonia.

Analizando la relaciones evolutivas con el criterio de parsimonia máxima y a través de una búsqueda “exhaustiva” analizando todos los taxa (30), incluyendo las tres posiciones del triplete, se obtuvieron 33 árboles igualmente parsimoniosos de 143 pasos cada uno, con Índice de consistencia (CI) = 0,86014 y un Índice de Retención (RI) = 0,954545. Todas las tipologías recogen como grupo aislado, sin asociación con otros taxa, a la cepa Marinkellei M1117 (Brisse *et al.*, 2000) proveniente de Brasil, obtenida de la especie *Phyllostomum hastatus* (murciélago insectívoro del Amazonas). Asimismo todos los árboles obtenidos, como también la topología de consenso, muestra tres clados muy definidos con altos valores de “bootstrap”; estos fueron designados como Clado A, Clado B y Clado C. (Figura N° 8 y 9)

El Clado A se presenta como un grupo monofilético donde se encuentran las tres secuencias obtenidas de Cabra, las dos de *O. degus* y la cepa A04.F originaria del parásito vector *M. spinolai*. Estas cepas se presentan relacionadas con cuatro secuencias obtenidas de Gen Bank las cuales tienen diversos países de origen y diferentes hospederos. Sin embargo, todas estas cepas fueron clasificadas como *T. cruzi* I y Zimodema 1 (Z1) según análisis isoenzimáticos. (Brisse *et al.*, 2000)

El Clado B es el que mayor número de taxa presenta, con un total 15 cepas de las cuales dos fueron secuenciadas en este estudio, que corresponden a la cepa V195 (*T. infestan*) y la SAP6.p18 (humano). Esta línea corresponden a los *T. cruzi* zimodema 2 (Z2) presentándose *T. cruzi* tipo IIa, IIb y IIc para la nomenclatura internacional (Brisse *et al.*, 2000), y Zimodema 3 (Z3), *T. cruzi* IIc para la nomenclatura internacional.

El Clado C corresponde a *T. cruzi* IIb y Zimodema 2 (Z2) con cuatro secuencias, dos de las cuales corresponde a la misma cepa CBB, una proveniente de la publicación de Brisse y colaboradores (Brisse *et al.*, 2000) y la otra, secuenciada en este estudio, expresándose las dos como clones, sin contradicciones, lo cual nos indica que tanto la técnica de laboratorio como de secuenciación y alineamiento, están realizadas de manera correcta.

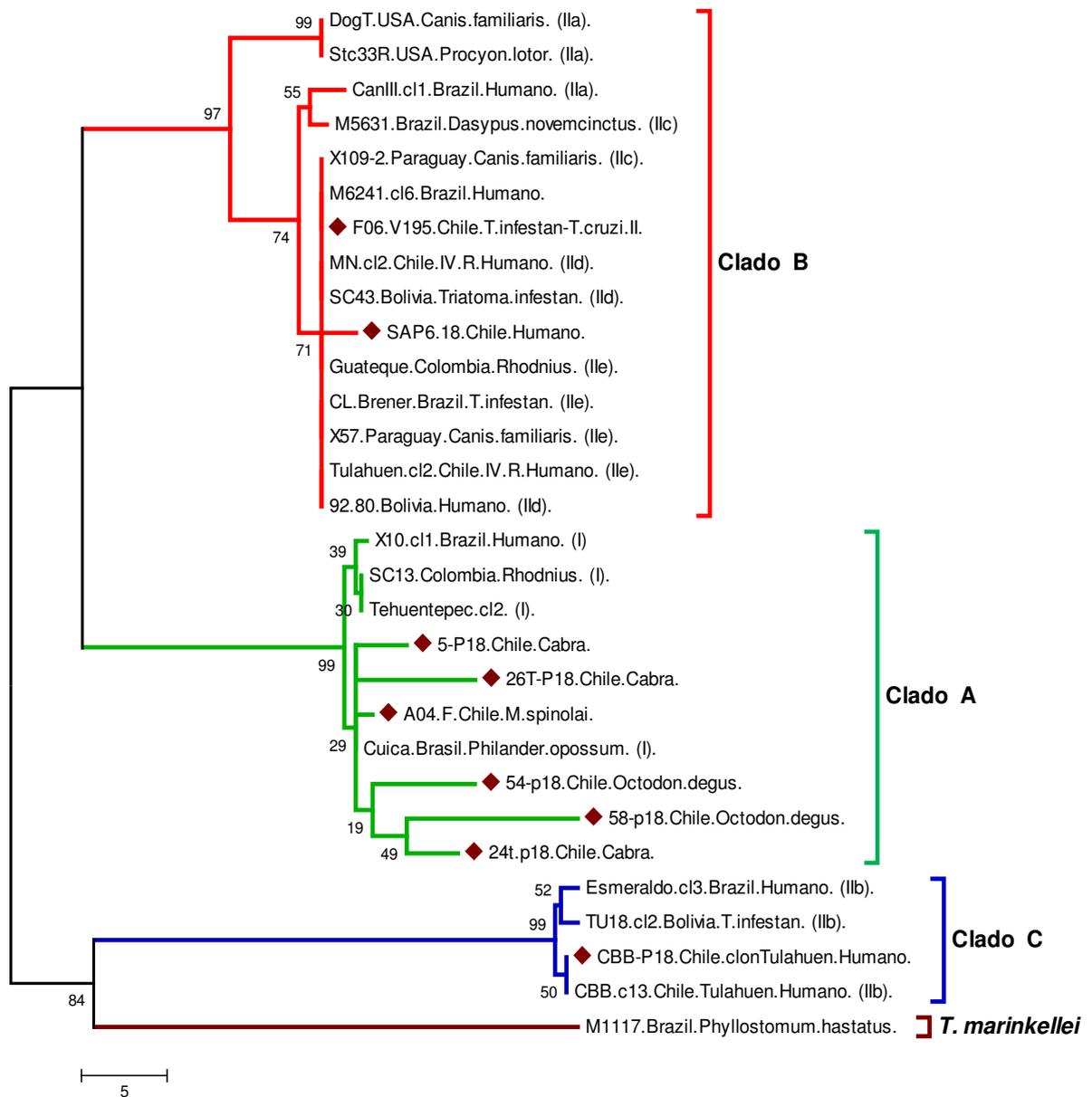


Figura 8: Relaciones filogenéticas de *T. cruzi* basados en la secuencia del gen para citocromo *b*. Árbol de Máxima Parsimonia a través de una búsqueda “exhaustiva” analizando todos los taxa (30), incluyendo las tres posiciones del triplete. Largo de los árboles(L)= 143 pasos cada uno, con Índice de consistencia (CI) = 0,86014 y un Índice de Retención (RI) = 0,954545. Los números sobre los nodos, representan valores (en porcentajes) del bootstrap de 500 replicas. Se muestra nombre de la cepa, país de origen, huésped y clasificación del linaje. El símbolo ◆ indica las cepas secuenciadas en el presente estudio. El árbol se presenta a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas usadas para deducir el árbol filogenético.



Figura 9: Relaciones filogenéticas de *T. cruzi* basados en la secuencia del gen para citocromo *b*. Árbol de Máxima Parsimonia a través de una búsqueda “exhaustiva” analizando todos los taxa (30), incluyendo las tres posiciones del triplete. Largo de los árboles (L)= 143 pasos cada uno, con Índice de consistencia (CI) = 0,86014 y un Índice de Retención (RI) = 0,954545. Los números sobre los nodos, representan valores (en porcentajes) del bootstrap de 500 replicas. Se muestra nombre de la cepa, país de origen, huésped y clasificación del linaje. El símbolo ♦ indica las cepas secuenciadas en el presente estudio. Árbol tipo curvo.

5.5.2.- Distancia.

Se evaluó las relaciones filogenéticas mediante este criterio, analizando las topologías de los árboles obtenidos con el algoritmo de unión del vecino más próximo (“Neighbor-Joining”) y usando la distancia de “Kimura-2-parámetros” (Kimura, 1980). El árbol se presenta a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas usadas para deducir el árbol filogenético. Se incluyen las tres posiciones del triplete. Todas las posiciones en las cuales existían saltos o datos faltantes, fueron eliminadas del análisis usando la opción “Complete deletion option”. El análisis mostró una topología similar a la obtenida bajo Máxima Parsimonia, apoyando los tres clados con altos valores de “bootstrap”, sin cambios en su composición (Figura N° 10 y 11).

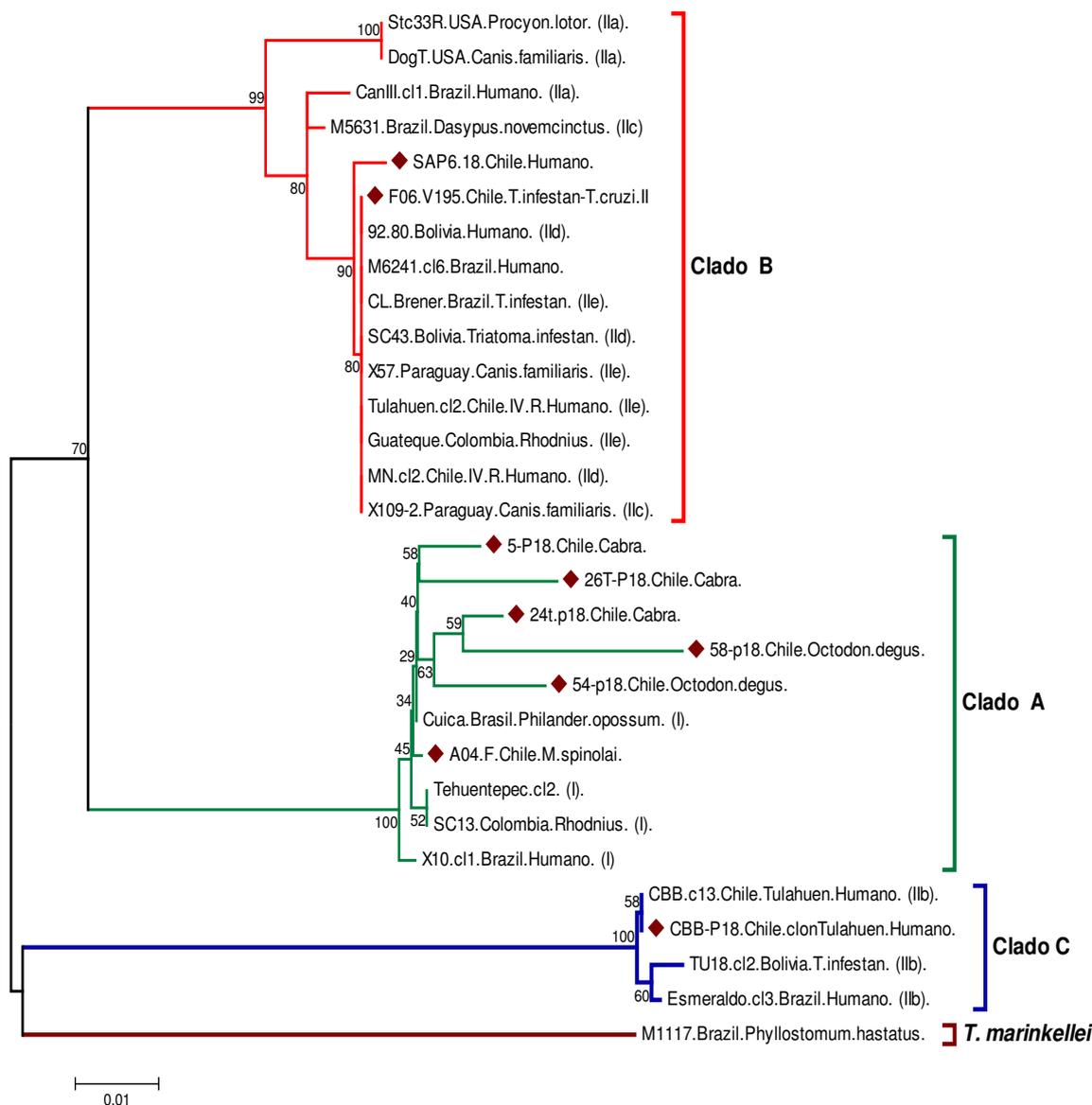
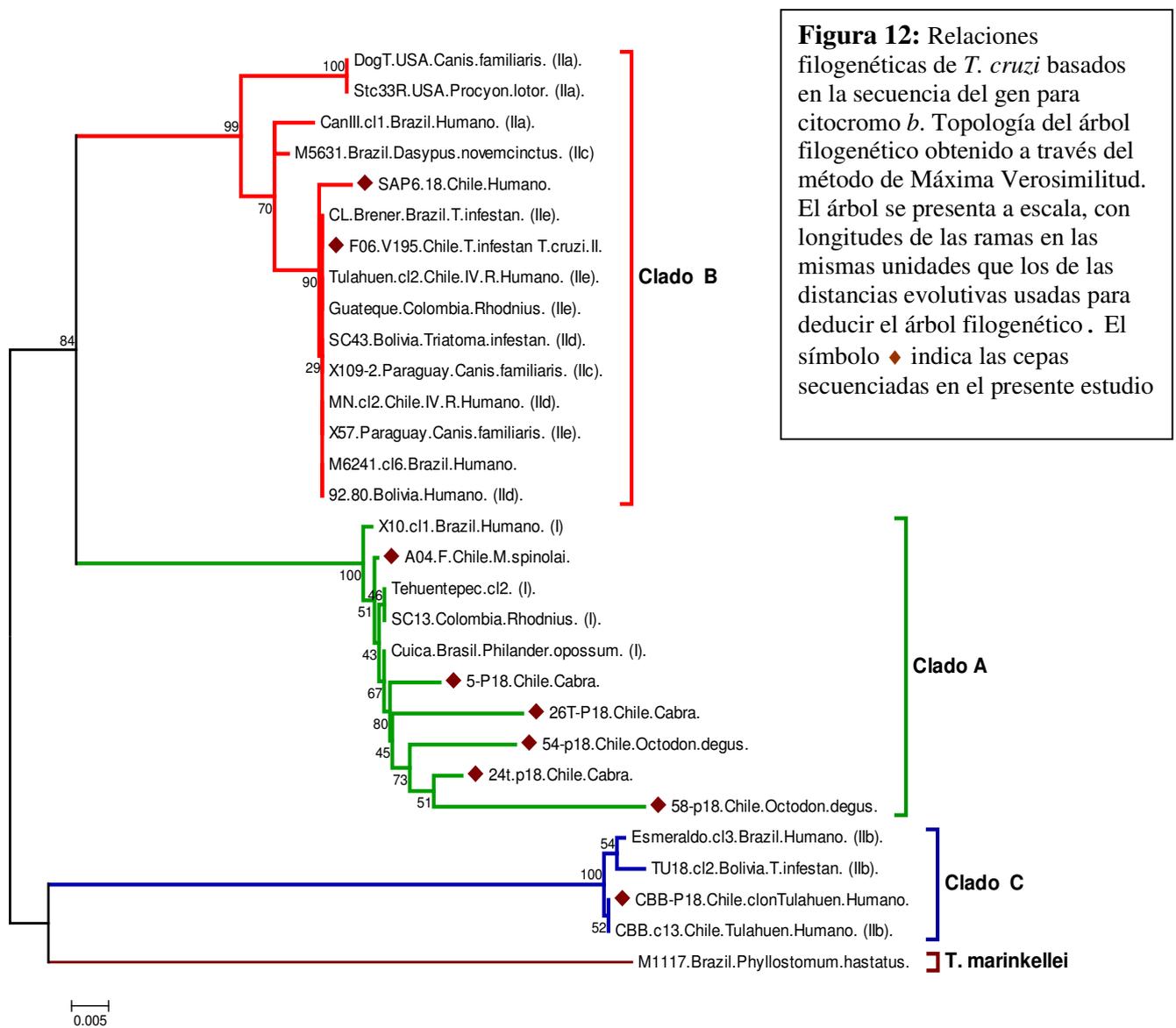


Figura 10: Relaciones filogenéticas de *T. cruzi* basados en la secuencia del gen para citocromo *b*. Topología del árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo de unión del vecino más próximo “Neighbor-Joining” y usando la distancia de Kimura-2-parámetros (Kimura, 1980). El árbol se presenta a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas usadas para deducir el árbol filogenético. Muestra todos los taxa (30), incluyendo las tres posiciones del triplete. El símbolo ◆ indica las cepas secuenciadas en el presente estudio. Los números sobre los nodos, representan valores (en porcentajes) del bootstrap de 500 replicas. Se muestra nombre de la cepa, país de origen, huésped y clasificación del linaje.

5.5.3.- Máxima Verosimilitud.

El uso del programa PAUP para la búsqueda del árbol más verosímil, analizando todos los taxa, incluyendo las tres posiciones del codón y todos los caracteres, entregó una topología similar a la observada antes a través de los análisis de parsimonia máxima y distancia realizadas en las mismas condiciones, con una suma de la longitud de sus ramas de 0.34146425. El árbol se presenta con los tres cladogramas compuestos por los mismos taxa que se presentaron en los análisis anteriores y de la misma manera, con altos valores de bootstrap que apoyan, de forma confiable, esta topología (Figura N° 12 y 13).



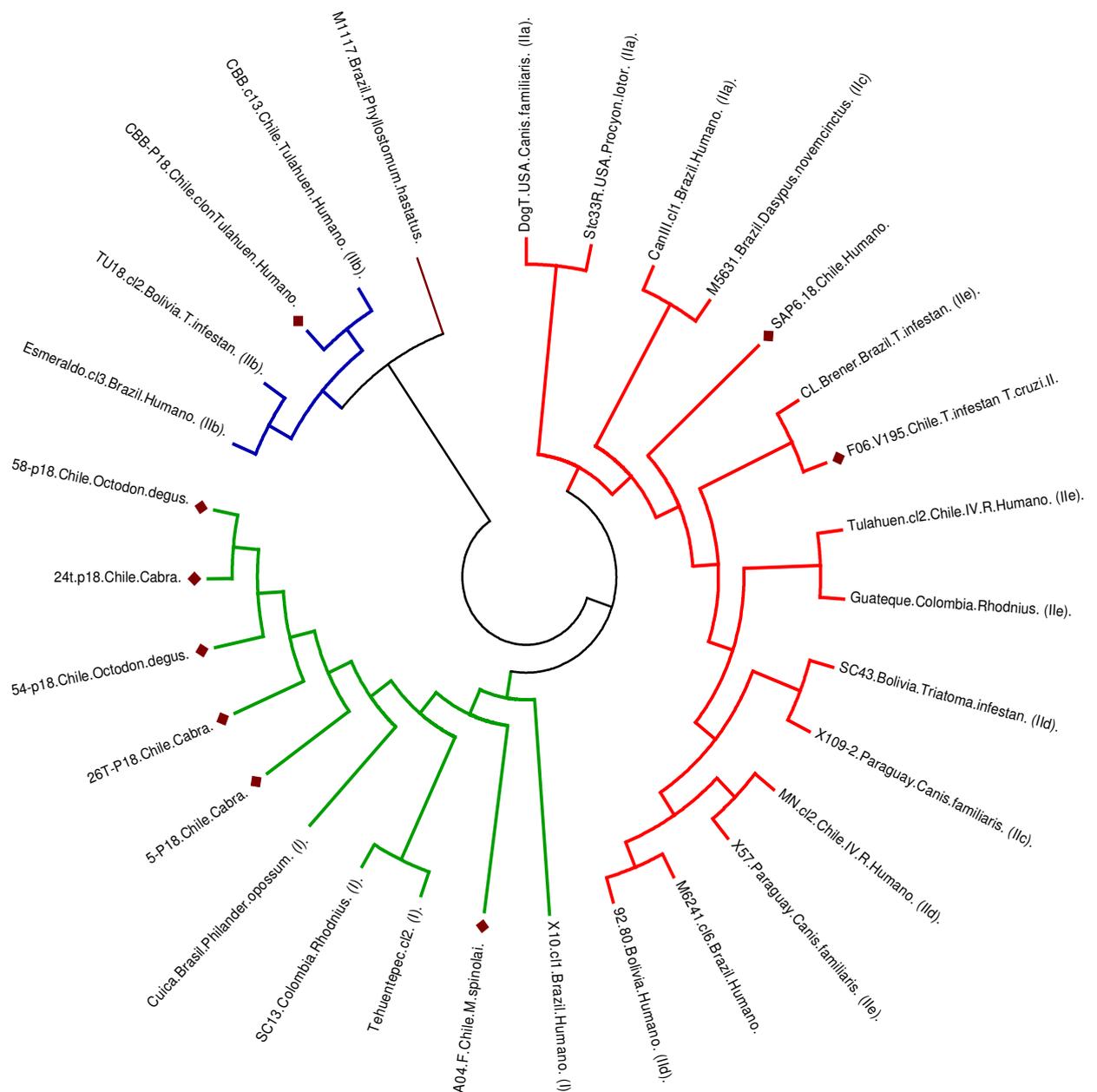


Figura 13: Relaciones filogenéticas de *T. cruzi* basados en la secuencia del gen para citocromo *b*. Topología del árbol filogenético obtenido a través del método de Máxima Verosimilitud. El árbol se presenta a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas usadas para deducir el árbol filogenético. Muestra todos los taxa (30), incluyendo las tres posiciones del triplete. El símbolo \blacklozenge indica las cepas secuenciadas en el presente estudio. Los números sobre los nodos, representan valores (en porcentajes) del bootstrap de 500 replicas. Se muestra nombre de la cepa, país de origen, huésped y clasificación del linaje. Árbol tipo circular

VI DISCUSIÓN.

6.1.- Composición nucleotídica del gen para citocromo b.

La composición de nucleótidos presentó un sesgo con bajas cantidades de citosina (8,4%) en la totalidad de los taxa, siendo la primera posición la de mayor déficit de citosina (gráfico 1). Por otra parte existe un sesgo con altos niveles de timina (47,6%), presentándose esto en todas las cepas, siendo la segunda posición, además de la más conservada, la de mayor presencia de timina (50,2%). Sin embargo, y aunque esta observación es consistente con otros estudios realizados en protozoos (Luyo-Acero. *et al*, 2004) se rechazaría la hipótesis que supone una distribución de bases equilibrada en cada posición del triplete. Este tipo de desequilibrio está dado por la presión de selección que fija diferentes mutaciones, y que dependen de sus efectos sobre la adecuación de los individuos que la poseen y de la de sus descendientes, es decir, si estas mutaciones son ya deletéreas o neutrales, sería un asunto del azar y aparecerían aleatoriamente con una tasa probablemente constante. En el caso del citocromo *b* este desequilibrio estaría relacionado con la hidrofobicidad de la molécula, por lo tanto, este sesgo podría resultar de restricciones que mantienen los residuos hidrofóbicos en posiciones particulares de la proteína (Naylor *et al*, 1995).

Entre los factores que determinan si las mutaciones son neutrales o deletéreas, se encuentran diferencias en presión de selección sobre cada una y diferencias respecto a restricciones funcionales o estructurales de los productos génicos que codifican, que en el caso del citocromo *b*, corresponde a una proteína de la cadena transportadora de electrones, vital para el metabolismo de cualquier célula. Por lo tanto, no es sorprendente que la distribución de aminoácidos variables en el citocromo *b* no sea aleatoria.

En las cepas aquí estudiadas, la primera posición del triplete resultó muy conservada, sin embargo la segunda posición del triplete lo fue aún más, quedando la tercera como la posición más variable. La tercera posición del código genético nuclear y mitocondrial es redundante, de manera que la identidad de esta posición importa menos para el apareamiento del RNA de transferencia con el aminoácido correspondiente, pudiendo resultar apareamientos inespecíficos (descritos como hipótesis de Wobble), que

podrían ser responsable de la mayor variación encontrada en la secuencia nucleotídica de esta posición. Se espera entonces, que la mayoría de los cambios afectarán la tercera posición del codón y deberían ser del tipo silencioso, producto de la degeneración del código genético, en el que las mutaciones del ADN no alteran los aminoácidos de la proteína.

6.2.- Variabilidad de las secuencias para citocromo *b*.

Puesto que las transversiones son menos probables en origen que las transiciones y se acumulan a través del tiempo, es más probable que sean detectadas (Marín, 2004). Esto concuerda con nuestros resultados, en los que fueron en promedio tres veces más comunes que las transiciones. Además, las transversiones fijadas en estos organismos, pueden en la mayoría de los casos modificar el aminoácido, sin afectar la función del citocromo *b*. Reafirma esta idea la observación de regiones variables en la secuencia estudiada, en contraste a otras muy conservadas en todas las cepas estudiadas.

6.3.- Relaciones Filogenéticas.

Todos los análisis realizados muestran a la cepa M1117, cuyo origen es Brasil, obtenida del murciélago insectívoro *P. hastatus*, como grupo externo sin integrar alguno de los clados formados por las diferentes topologías.

Al comparar y analizar las relaciones filogenéticas, se observa una marcada distribución de las cepas estudiadas, formando topologías de tres linajes o clados principales, siendo designados como Clado A, Clado B y Clado C.

Los estudios realizados nos indican que las cepas cuyo origen son las cabras y el *O. degus*, se presentan como grupo hermano. Esto se observa en todas las topologías que se generaron, formando un solo clado (Clado A) con elevadas validaciones estadísticas (“bootstrap”). Por lo tanto, este conjunto de cepas sumado a las cepas descritas en GenBank pertenecientes al CladoA, formarían un grupo monofilético.

En el caso del Clado C, en todos los análisis observamos a las cepas CBB c13 (*T. cruzi* IIb) como cepa hermana o clon de la CBB p18, secuenciada en este estudio, lo cual corrobora que la técnica de laboratorio y el análisis filogenético es confiable.

El Clado B, el mayor en número (15) de los tres cladogramas, se presenta como un grupo monofilético, donde se agrupan cepas clasificadas como *T. cruzi* tipo IIa, IIc, IIe y IIf según la clasificación internacional.

En todas las topologías, en el Clado B se forman dos subgrupos. El más importante, considerando sus elevados valores de “bootstrap” (100), es el que está formado por las cepas Stc33R y DogT, ambas *T. cruzi* tipo IIa (Zimodema 3) cuyo origen es Estados Unidos. El otro subgrupo de este clado está formado por las cepas M5631 de Brasil (*T. cruzi* IIc) y la cepa Can III (*T. cruzi* IIa) también de Brasil, sin embargo se presenta con menores valores de validación estadística (“bootstrap”) a pesar de presentarse en todos los árboles de los diferentes análisis realizados.

El Clado B es el que se muestra más heterogéneo en cuanto a la clasificación de las cepas que la integran. En la literatura existen importantes estudios en base a DNA mitocondrial (Tibayrenc, 1998), DNA nuclear (Machado y Ayala, 2001), estudios de cariotipo y secuenciación de la región promotora del rRNA (Brisse *et al.*, 2000), que desarrollan hipótesis para explicar esta heterogeneidad. La más aceptada es la hibridación de los diferentes linajes divergentes a través de la reproducción sexual del *T. cruzi* en forma natural.

Se acepta que *T. cruzi* principalmente presenta una estructura predominantemente clonal (Brisse *et al.*, 2000; Machado y Ayala, 2001). Sin embargo el modelo de desarrollo poblacional de tipo clonal es compatible con ocasionales intercambios de tipo sexual, en los cuales sucede intercambio genético entre diferentes *T. cruzi* pudiendo ser éstos de diferentes cepas y de diferentes linajes o cladogramas, lo cual explicaría la diversidad del Clado B y la incongruencia de las topologías obtenidas con otros estudios en base a secuenciación de la región promotora del rRNA (Brisse *et al.*, 2000).

Se estima que el antepasado reciente del *T. cruzi* se localiza hace 100 Millones de años (Machado y Ayala, 2001) momento cuando se separan *Trypanosoma brucei* (África) de *T. cruzi* (América) de su ancestro común, lo cual concuerda con la evidencia biogeográfica de la separación de Gondwana, lugar de origen de los tripanosomas, con la

posterior formación del continente Africano y Americano. Una hipótesis es que posterior a esta separación, tres linajes de *T. cruzi* quedaron aislados geográficamente, con la consiguiente formación de los tres clados principales que muestran todos los análisis realizados. Este desarrollo poblacional se habría impulsado principalmente en forma clonal y posteriormente se produciría un intercambio genético reciente entre los distintos clados mediante reproducción sexual del *T. cruzi*, dando lugar a la heterogeneidad del Clado B, explicado por la presencia híbrida de sus ancestros cercanos.

Los estudios realizados por Machado y Ayala (Machado y Ayala, 2001), a partir de dos secuencias de DNA nuclear; y los estudios efectuados por Brisse y colaboradores (Brisse *et al.*, 2000) obteniendo secuencia de DNA mitocondrial de maxicírculos y la región promotora del rRNA, a partir de DNA nuclear, proporcionan el convencimiento de la evidencia de intercambio e hibridación genética del *T. cruzi* entre cepas divergente, mediante reproducción sexual. Sin embargo, se acepta a la reproducción asexual como la principal fuente de crecimiento poblacional, con una evolución clónica de sus linajes, siendo la reproducción sexual y la hibridación genética un suceso raro. Estos estudios además confirman los resultados obtenidos en la presente memoria, confirmando la existencia de tres clados principales distribuidos geográficamente en países del norte, centro y Sudamérica, exponiendo la amplia distribución del parásito, y su importancia en la salud pública de América. No se observa una asociación clara de un patrón biogeográfico al patrón molecular estudiado.

En el presente estudio, las cepas secuenciadas pertenecen principalmente al CladoA (*T. cruzi* tipo I), lo que concuerda con la caracterización bioquímica e isoenzimática (Zimodema 1) realizada en investigaciones previas para *T. cruzi* de animales silvestres, domésticos y semidomésticos de la zona norte del país. Sin embargo, al analizar el conjunto total de secuencias resultantes, se observa que existe representación en los tres linajes (Clado A, B y C), lo que expone la diversidad de las cepas circulando en territorio chileno.

VII CONCLUSIONES.

- 1.- Los tres tipos de análisis (Máxima parsimonia, Distancia y Máxima verosimilitud), en los que se incluyeron las nuevas muestras, entregan una topología de tres clados principales (Clado A, B y C)
- 2.- A partir de las distintas topologías obtenidas en los tres análisis, incluyendo las 30 secuencias en estudio, no se asocia claramente un patrón biogeográfico al patrón molecular estudiado.
- 3.- De las cepas pertenecientes al ciclo silvestre del parásito de la IV región (*C. hircus*, *O. degus*, y *M. spinolai*), secuenciadas en este estudio, todas se agruparon en el Clado A clasificado como *T. cruzi* I, mostrándose como grupo monofilético.
- 4.- Las cepas originarias de Chile (todas de la IV Región), se distribuyen en los tres clados.
- 5.- Los análisis filogenéticos sustentan la teoría de la evolución clónica de sus linajes como la principal fuente de crecimiento poblacional.
- 6.- La cepa M117 (*T. cruzi marinkellei*), cuyo origen es Brasil, se muestra en todos los análisis como grupo externo, sin integrar alguno de los clados formados por las diferentes topologías.
- 7.- El Clado B es el que se presenta mas diverso, con cepas clasificadas como *T. cruzi* IIa, IIc, IId y IIe.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- **ACQUATELLA, H.** 1998. Herat pathology of extracardiac origin: recent advances in chagasic cardiomiopatý. *Rev. Esp. Card.* 51: 152-157.
- **ANON.** 1996. La enfermedad de Chagas en las América, informe de progreso de las actividades en los países del cono sur. *Bol. Epidemi. OPS.* 27(4): 2-3.
- **ANON.** 2000. Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. día.* 24: 10-13.
- **ANON.** 2003. Evaluación programa de Chagas en países del Cono Sur. **In:** XIIa Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas. Santiago, Chile. Marzo 2003. OMS.
- **AÑES, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; RAMÍREZ, J.** 1999. Myocardial parasite persistence in choronic Chagas patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(5): 726-32.
- **ATÍAS, A.** 1998. *Parasitología Médica. Mediterráneo.* Santiago, Chile 251 p.
- **AYALA, F.** 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structure of epidemiológical significance. *Biol. Res.* 26: 47-63.
- **ANDRADE S.** 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Patol. Trop.* 3: 65-121.
- **BARRET T; HOFF R; MOTT K; MILES M; GODFREY D; TEIXEIRA R; ALMEIDA DE SOUZA J; SHERLOCK I;** 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 84-90.
- **BERRA, H.; CARNEVALI, F.; RVELLI, S.; MORENO, H.; MARIS PEZZOTO, S.; MORINI, J.; BOTTASSO, O.** 1998. Electrocardiographic alterations in choronically *Trypanosoma cruzi* infected persons exposed to cardiovascular factors. *Arch. Med. Res. Autumn.* 29(3): 241-6.
- **BRASHEAR, R.; WINKLER, M.; SCHUR, J.; LEE, H.; HALL, H.; PAN, A.** 1995. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western Unites States. I. Evaluation of the sensitivity and especificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *Trypanosoma cruzi* transfusion. 213-218.
- **BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M.** 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp.

- **BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: how many relevant phylogenetic subdivisions are there?. Parasitol. Today. 14: 178-179.
- **BRISSE, S; DUJARDIN, J.C; TIBAYRENC, M.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. Mol. Biochem. Parasitol. 111: 95-105
- **BRITTO, C.; CARDOSO, M.; RAVEL, C.; SANTORO, A.; PEREIRA, J.; CAURA, J.; MOREL, C.; WINCKER, P.** 1995. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of Kinetoplast DNA and nonradiative. Exp. Parasitol. 81(4): 462-471.
- **CANALS, M; CATTAN, A.** 1992. Dinámica de transmisión de la infección chagásica en Chile: modelo y simulación. Rev. méd. de Chil. Vol.120, no.12 (dic. 1992):1359-1365.
- **CANÇADO, J.** 1979. Forma aguda de la enfermedad de Chagas en Brasil. Rev. Assoc. Med. Bras. 25: 112.
- **CARDONI, R.** 1997. La respuesta inflamatoria en la infección aguda por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Med. de Chil. 57(2): 227-34.
- **CASTRO, C.; MACEDO, V.; PRATA, A.** 1999. Comportamiento da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 años. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32(2): 157-65.
- **CLARK C; PUNG O.** 1994. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. Mol. Biochem. Parasitol. 66: 175-179.
- **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2007. Parasite image library. Trypanosomiasis American. [en línea]. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_i1.htm> [consulta: 05-5-2007]
- **DE ANDRADE, A.; Ziker, F.; RASSI, A.; OLIVEIRA, R.; SILVA, S.; MARTELLI, C.** 1998. Early electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositiva children. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59(4): 530-4.
- **DE OLIVEIRA, R.; TRONCON, L.; DANTAS, R.; MENGHELLI, U.** 1998. Gastrointestinal manifestations of Chagas` disease. Am. J. Gastroenterol. 93(6): 884-6.
- **DIAS, J.; DIAS, E.** 1968. Considerações acerca de 67 casos da Doença de Chagas Agudo. O. Hosp. 73: 257.

- **FERREIRA, A.; AVILA, S.** 1995. Laboratory diagnosis of Chagas Herat disease. *Rev. Paul. Med.* 1995. 113(2): 767-771.
- **FREEMAN, S.; HERRON, J. C.** 2002. Análisis evolutivo. Segunda edición. Editorial Pearson Educación SA, Madrid, España. 437 p.
- **FREILIJ, H.; ALTCHER, J.** 1995. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21(3): 551-555.
- **FREILIJ, H.; ALTCHER, J.** 1998. Respuesta terapéutica al Nifurtimox en pacientes de edad pediátrica con enfermedad de Chagascrónico de la ciudad de Buenos Aires. Argentina. *Rev. Pat. Trop.* vol: 28.
- **FORATTINI, O.; FERREIRA, O.; ROCHA E SILVA, E.; ROBELLO, E.; SANTOS, J.** 1971. Aspectos ecológicos da tripanosomiase americana. II Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificias. *Rev. Saúd. Púb.* 5: 163-191.
- **GAVIN, J.; MAXWELL, L.; EDGAR, S.** 1998. Microvascular involvement in cardiac pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30(12): 2531-2540.
- **HAYES, R.; SCHOFIELD, C.** 1990. Estimación de las tasa de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: La enfermedad de Chagas en América latina. *Bol. Saint. Panam.* 108: 308-3016.
- **HOLBERT, R.; MAGIROS, E.; HIRSCH, C.; NUNENMACHER, S.** 1995. Chagas disease: a case in South Mississippi. *J. Miss. State Med. Assoc.* 36; 1-5.
- **JUNQUEIRA, A.C.; CHIARI, E.; WINCKER, P.** 1996. Comparision of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trnas. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90(2): 129-132.
- **KIERSZENBAUM, J.** 1999. Chagas disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(2): 210-23.
- **KIMURA, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- **KUMAR, S; TAMURA, K; NEI, M.** 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- **LEWINSOHN, R.** 1981. Carlos Chagas and the dyscovery of Chagas` disease (American trypanosomiasis). *J. R. Soc. Med.* 1981 June; 74(6): 451-455.

- **LEE, J.J.; HUNTNER, S.** 1985. Illustrated wide to the protozoa. Soc. Protozoo:144.
- **LENT, H.; WYGODZINSKY, P.** 1979. Revision of the Triatominae (Himeptera Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 5: 163-191.
- **LOPEZ, B.; LIDID, L.; SANCHEZ, E.; ZULANTAY, I.; APT, W.** 2001. Trastornos digestivos secundarios a enfermedad de Chagas en 40 egresos con diagnósticos de megacolon, fecalota, obstrucción intestinal o acalasia en el hospital Barros Luco Trudeau durante el año 1999. Parasitol. día. 25: 716-720.
- **LORCA, M.; BEROIZA, A.; MUÑOZ, P.; GUAJARDO, U.; SILVA, J.; CANALES, M.; ÁTIAS, A.** 1987. Estudio Materno infantil de enfermedad de Chagas en zonas endémicas III: Salamanca, Valle del Choapa, Chile. Parasitol. día. 11: 97-100.
- **LORCA, M.; GONZALEZ, A.; REYES, V.; VELOSO, C.; VERGARA, U.; FRASCH, C.** 1993. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica mediante antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Med. Chil. 121: 363-368.
- **LUGONES, H.** 1959. Consideraciones acerca de los síntomas del periodo agudo de la enfermedad de Chagas en la infancia. Ana. Cong. Int. Doen. Chagas. Rio de Janeiro, Brasil. 3: 861-870.
- **LUYO-ACERO G; UEZATO H; OSHIRO M; TAKEI K; KARIYA K; KATAKURA K; GOMEZ LANDIRES E; HASHIGUCHI; NONAKA S.** 2004. Sequence variation of the cytochrome *b* gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitol. 128 (5):483-91
- **MACHADO, A; AYALA, F.** 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi* PNAS. 98(13): 7396 -7401.
- **MARIN, J.C.** 2004. Filogenia molecular, filogeografía y domesticación de camélidos Sudamericanos (*Artiodactyla camelidae*). Tesis Doctorado en Ciencias Biomedicas. Santiago, Chile. U. de Chile. 245 p.
- **MAZZA, S.; FREIRE, R.; URCELAY, G.; MIYARA, S.; BASSO, R.; CONTE, D.** 1940. Chagomas. Pub. M.E.P.R.A. Bol. 46.
- **MEDICINENET INC. ANSWERS.COM.** 2007. Chagas' disease. [en linea] <<http://www.answers.com/topic/chagas-disease>> [consulta: 09-05-2007].
- **MILES, M.** 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas` disease in Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 221-237.

- **MUÑOZ, P.; THIERMANN, E.; ÁTIAS, A.; ACEVEDO, C.** 1992. Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. *Rev. Chil. Pediat.* 65(4): 196-202.
- **MUÑOZ, P.; THIERMANN, E.** 1990. Infección congénita en toxoplasmosis y enfermedad de Chagas. *Enf. Parasit: Series Clínicas Soc. Méd. Santiago, Chile. Ed. Med.* 59-74.
- **NAYLOR G.; COLLINS T.; BROWN W.** 1995. Hydrophobicity and phylogeny. *Nature.* 373(6515):565-6
- **NOIREAU F, BRENIÈRE F, ORDOÑEZ J, CARDOZO L, MOROCHI W, GUTIÉRREZ T, BOSSENO, MF, GARCIA S, VARGAS F, YAKSIC N, DUJARDIN JP, PEREDO C, WISNIVESKY-COLLI C,** 1999, Baja probabilidad de transmisión de *Trypanosoma cruzi* a humanos por *Triatoma sordida* domiciliado en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia. pp. 139-150.
- **OCHS, D; OTSU, K; TEXEIRA, S; MOSER, D; KIRCHHOFF, L.** 1996. Maxicircle genomic organization and editing of an ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76: 267-278.
- **ÓRDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.; CANALS, M.** 1996. Infección tripano-triatomina de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Rev. Med. Chil.* 124: 1053-1057.
- **PAGE R.; HOLMES E.** 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach.* Blackwell Science, Oxford, U.K.
- **PAYS, J.** 1999. Human American tripanosomiasis 90 years after its discovery by Carlos Chagas. Clinical aspects, Physiopathology, diagnosis and treatment. *Med. Trop.* 59(1): 79-94.
- **PRATA, A.** 1990. Formas clínicas da Doença de Chagas. En *Doença de Chagas*, Ed. Romeo Cançado, Belo Horizonte: 344-358.
- **PROCÓPIO D. O; BARROS H. C; MORTARA R. A.** 1999. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Cell. Biol.*; 78(12):911-24.
- **REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; CARRIERE, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* 89(1): 30-39.
- **REZENDE, J.; MOREIDA, H.** 1988. Chagasic megaesophagus and megacolon: historical review and present concepts. *Arq. Gastroenterol.* 25: 32-43.

- **ROMANHA, A.** 1979. Izoenzyme patterns of *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 62: 139-142.
- **ROSSE, N.** 1998. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin. Immunol.* 10(1): 5-13.
- **ROSSELL, R.; RODRIGUEZ, A.** 2000. Tripomastigotes de sangre y cultivo celular de *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. dia.* 24: 1-14.
- **RASSI, A.; BORGES, C.; REZENDE, J.; CARNEIRO, O.; SALUM, J.; RIBEIRO, I.**; 1958. Fase Aguda da doença de Chagas, aspectos clínicos observados em 18 casos. *Rev. goiania. Med.* 4: 161.
- **SAITOU, N.; NEI M.** 1987 The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- **SAIKI, R; SCHARF, S; FALOONA, F; MULLIS, K; HORN, G; ERLICH, H;** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia *Science.* 230: 350-354.
- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.; DOMINGUEZ, J.; ROJAS, A.; VILLAROEL, F.** 1985. Enfermedad de Chagas congénita en Chile. Estudio longitudinal de la reproductividad de mujeres chagásicas y no chagásicas y de algunos parámetros parasitológicos y clínicos de ellas y de sus correspondientes hijos. *Bol. Chil. Parasitol.* 40: 24-29.
- **SCHMUNIS, G.** 1994. La tripanosomiasis americana como problema de salud pública. Cap 1, En la enfermedad de Chagas y el sistema nervioso. OPS Buenos Aires Argentina. *Pub. Cien.* 547.
- **SILVA, A.; ROFF, A.; MARINO, A.; DOS SANTO, P.; QUIRICO-SANTOS, T.; PAIVA, C.; LANNES-VIEIRA, J.** 1999. Chaga` disease encephalitis: intense CD8+ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol.* 92(1): 56-57.
- **SOLARI, A.; LORCA, M.; CONTRERAS, M.; GARCÍA, A.; SALINAS, P.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; SCHENONE, H.** 1998. Rendimiento del xenodiagnóstico y el PCR para evaluar el tratamiento quimioterápico específico de la enfermedad de Chagas en niños. *Bol. Chil. Parasitol.* 53:27-29.
- **SOLARI, A.; SPOTORNO, A.** 2002. Proyecto "Coevolución entre parásitos, vectores y reservorios de la enfermedad de Chagas, e implicancias en la eventual domiciliación de vectores silvestres." Santiago, Chile. U de Chile, Fac. de Medicina 65 p. Proyectos Fondecyt.

- **SOUTO, R.; FERNANDEZ, O.; MACEDO, C.; CAMBELL, D.; ZINGALES, B.** 1996. DNA markers define two major phylogenetic linajes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 60: 71-80.
- **SPOTORNO, A.** 1984. Conceptos y métodos en cariólogía descriptiva y comparada. Departamento de Biología Celular y Genética, Unidad de Citogenética, Facultad de Medicina, U. de Chile. Santiago, Chile. 138 p.
- **SPOTORNO, A.; VALLADARES, J.P.; MARIN, J.C.; ZEBALLOS, H.** 2004.a. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationships with the Andean wild species *Cavia tschudii*. Rev. Chil. Hist. Nat. 77: 243-250.
- **SPOTORNO, A.; VALLADARES, J.P.; MARIN, J.C.; PALMA, E.; ZULETA, C.** 2004.b. Molecular divergente and phylogenetic relationships of chinchillids (Rodentia: Chinchidae). J. Mammalogy. 85 (3): 384-388.
- **TANOWITZ, H.; KIRCHHOFF, L.; SIMON, D.; MORRIS, S.; WEISS, L. WITTNER, M.** 1992. Chagas disease. Cli. Microbiol. Rev.: 400-419.
- **TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; MORRIS, S.; ZHAO, W.; WEISS, L.; HATCHER, V.; BRAUNSTEIN, V.; HUANG, H.; DOUGLAS, S.; VALCIC, M.; SPEKTOR, M.** 1999. The putative mechanistic basis for the modulatory role of endothelin-1 in the altered vascular tone induced by *Trypanosoma cruzi* endothelium. 6(3): 217-300.
- **TIBAYRENC, M. WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J.** 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 115-119.
- **TIBAYRENC, M.** 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol. 36: 47-115.
- **TIBAYRENC, M.** 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Intern. Parasitol. 28: 85-104.
- **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA.** 2007. Doença de Chagas tem dois agentes. Comunicado. [en línea]. <<http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed141/pesqui7.htm>> [consulta: 09-05-2007].
- **URBINA, J.** 1999. Chemoterapy of Chagas` disease: The how and The why. J. Mol. Med. 77(3): 332-338.

- **VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; GOLDMAN, M.** 1999. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cell and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* Aug. 67 (8): 4033-4040.
- **VERGARA, U.; LORCA, M.; VELOSO, C.; GONZALEZ, A.; ENGSTROM, A.; ASLUND, L.; PETERSON, U.; FRASCH, A.** 1991. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 29(9): 2034-2037.
- **WEBSTER, L.** 1987. Drogas empleadas en la quimioterapia de las infecciones protozoarias. En las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman y Gilman. 7ª Edición. Ed. Panamericana: 1006-1013.
- **ZHANG, L.; TARLETON, R.** 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas` disease. *J. Infect. Dis.* 180(2): 480-486.