



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



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DEL GEN PARA CITOCROMO B EN
MUESTRAS DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES EN INSECTOS
DEL GÉNERO *Mepraia* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE).

MARCO ARENAS DOREN

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

PROFESOR GUÍA: ALDO SOLARI ILLESCAS

SANTIAGO, CHILE
2011



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



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE
 SECUENCIACIÓN DEL GEN PARA CITOCROMO B EN
 MUESTRAS DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES EN INSECTOS DEL
 GÉNERO *Mepraia* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE).

MARCO ARENAS DOREN

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ALDO SOLARI ILLESCAS
PROFESOR CONSEJERO: MARIANA ACUÑA RETAMAR
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES MARTÍNEZ

SANTIAGO, CHILE
 2011

MEMORIA DE TÍTULO

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN PARA CITOCROMO B EN MUESTRAS DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES EN INSECTOS DEL GÉNERO *Mepraia* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)”.

“MOLECULAR CHARACTERIZATION BY CYTOCHROME B GENE SEQUENCING IN SAMPLES OF *Trypanosoma cruzi* CIRCULATING IN INSECTS OF THE GENUS *Mepraia* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)”.

Marco Antonio Arenas Doren ^{1,2}

¹ Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Financiado por Proyecto Fondecyt 1085184

² Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

Las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, presentan propiedades biológicas diferentes y es posible diferenciar dentro del taxón dos sublinajes, TcI y TcII, así como subgrupos de parásitos dentro de cada uno. El objetivo del presente estudio fue describir la diversidad molecular de las poblaciones de *T. cruzi* circulando en territorio chileno a partir de vectores silvestres de *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardo* obtenidos de diferentes áreas de Chile. Para dicho objetivo se utilizaron dos partidores, p18 y p20, diseñados en base a la secuencia de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. 516 pb del gen mitocondrial para citocromo b fueron secuenciados de 17 muestras biológicas, y comparadas filogenéticamente con otras 50 secuencias Sudamericanas. La caracterización molecular de estas 67 secuencias en un filograma de máxima verosimilitud permitió la identificación de tres clados previamente conocidos (TcI, TcII, y TcV junto con TcVI). TcI y TcII son genotípicamente heterogéneos. Por su parte TcV y TcVI son genotípicamente homogéneos y no diferenciados por secuenciación del gen para citocromo b.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*—Chile—Citocromo b.

ABSTRACT

Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, show different biological properties and is possible to differentiate two sub-lineages within the taxon, TcI and TcII, as well as subgroups of parasites within of each one. The aim of this study was describe the molecular diversity of the populations of *T. cruzi* circulating in Chilean territory from wild vectors *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardo* obtained from different areas of Chile. For this purpose we used two primers, p18 and p20, designed in based on the sequence of the Tulahuén strains of *T. cruzi*. 516 bp of the mitochondrial cytochrome b gene were sequenced from 17 biological samples, and phylogenetically compared with other 50 South American sequences. The molecular characterization of these 67 sequences in a maximum likelihood phylogram allowed the identification of three previously known clusters (TcI, TcII, y TcV junto con TcVI), TcI and TcII are genotypic heterogeneous. Meantime TcV and TcVI are genotypic homogeneous and not differentiated by cytochrome b gene sequencing.

Key words: *Trypanosoma cruzi*—Chile—Cytochrome b.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi agente etiológico de la enfermedad de Chagas, infecta cerca de 20 millones de personas en Sudamérica y Centroamérica, con más de 20.000 muertes reportadas cada año (de Freitas *et al.*, 2006). *Trypanosoma cruzi* se transmite a los seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos silvestres, principalmente por insectos chupadores de sangre de la subfamilia Triatominae (Rassi *et al.*, 2010). Los triatominos 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) (Atías, 1998). En esta extensa región prevalecen las condiciones ecológicas favorables para la transmisión y la mantención de la parasitosis. En Chile, el área endémica se extiende desde el paralelo 18° en el norte (XV Región de Arica y Parinacota), hasta el paralelo 34° (VI Región de O'Higgins) (Anon, 1996).

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

Cuando se estudian las cepas de *T. cruzi* aisladas de mamíferos e insectos vectores, se observa una gran variabilidad en morfología, virulencia y en la susceptibilidad a los agentes quimioterápicos, lo que difiere de los modelos experimentales (Solari *et al.*, 1998a). La variabilidad genética del parásito ha sido ampliamente estudiada por métodos biológicos, bioquímicos y métodos moleculares, y podría explicar las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (cardiaca, megaesófago y megacolon) y la diferencia geográfica en morbilidad y mortalidad (Rassi *et al.*, 2010). La heterogeneidad geográfica de *T. cruzi* sugiere que la variación genética del hospedero, parásito, o ambos son importante en establecer el tipo clínico de la enfermedad. Diferentes estudios han demostrado una gran variabilidad genética entre poblaciones de parásitos (Fernandes *et al.*, 1998), y un gran número de marcadores genéticos pueden ser utilizados para cuantificar la variabilidad genética dentro del taxón de *T. cruzi*, con mayor o menor nivel de resolución dependiendo de los marcadores utilizados (Fernandes *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 1996).

El estudio genético poblacional de *T. cruzi*, llevado a cabo por análisis isoenzimático, RNA ribosomal, genes de mini-exón y DNA genómico, han mostrado dos principales linajes filogenéticos, denominado *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Anónimo, 1999). *Trypanosoma cruzi* II puede

ser dividido en cinco sublinajes (TcII – TcVI) basados en datos isoenzimático y análisis por DNA polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) (Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2001). Recientemente un comité de expertos llegó a un consenso en la nomenclatura y categorización de las subdivisiones de *T. cruzi*, clasificándolo en seis “Unidades Discretas de Tipificación” o UDTs (DTU, "Discrete Typing Units"), *T. cruzi* I-VI. Una UDT es una colección de *T. cruzi* que están más estrechamente relacionados entre sí que con otros grupos cuando son caracterizados con marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (Zingales *et al.*, 2009). A pesar de las controversias existentes acerca de las relaciones filogenéticas entre las diferentes subdivisiones de *T. cruzi*, se han establecido algunos acuerdos generales basados en las evidencias disponibles en la actualidad: la evolución de los diferentes UDTs ha sido básicamente clonal, con algunos intercambios genéticos ancestrales y eventos de recombinación e hibridación que han tenido un impacto importante en la generación de diversidad genética dentro de este taxón (Gaunt *et al.*, 2003; Noireau *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2009). Se sugiere que TcI y TcII son los grupos más ancestrales en base a estudios genéticos moleculares, mientras que TcIII, TcIV, TcV y TcVI son híbridos generados por eventos de recombinación, siendo los dos últimos los más recientes (Westenberger *et al.*, 2005).

El DNA mitocondrial es un excelente marcador taxonómico debido a la tasa relativamente alta de mutaciones. En *T. cruzi*, el DNA mitocondrial o DNA del kinetoplasto (kDNA) se compone de maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos están presentes en varias docenas por células, con una longitud perimetral de ~22.000 pb. Transportan los genes mitocondriales y genes para citocromo (Westenberger *et al.*, 2006a). Por su parte, los minicírculos están formados por aproximadamente 10.000 a 20.000 copias por célula, con una longitud perimetral de 1.400 pb. El tamaño y estructura de minicírculos son especie específicos y están compuestos de cuatro regiones conservadas y cuatro regiones hiper-variables intercaladas. Las últimas presentan alta tasa de mutación, que confiere diversidad entre los minicírculos de los aislados (Avila y Simpson, 1995).

Los esfuerzos por comprender la composición genética y estructura poblacional de *T. cruzi* puede ser justificada por su correlación con la patogenicidad de algunas cepas. Si bien no se han encontrado correlaciones globales hasta ahora, hay muchas instancias de asociaciones locales entre genética del parásito y parámetros biomédicos (Campbell *et al.*, 2004; Tibayrenc, 1998).

La epidemiología de la enfermedad se ha vuelto más compleja debido a la existencia o participación de múltiples vectores, a la interacción reservorio-parásito y a los efectos geopolíticos, económicos y ecológicos (Lescure *et al.*, 2010). En Chile un género de triatomíneos

son transmisores de *T. cruzi*, los insectos del género *Mepraia* (*Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*) que están ampliamente distribuidos en el ciclo de infección silvestre. *Mepraia spinolai* es responsable de la transmisión de *T. cruzi* en zonas áridas y semiáridas de Chile (Lent *et al.*, 1994). Se distribuyen entre los 18° y 34° de latitud sur desde el nivel del mar hasta los 3.000 metros de altura (Botto-mahan *et al.*, 2005). Por su parte *Mepraia gajardoi* habita en la zona desértica costera de la XV Región de Arica y Parinacota, I Región de Tarapacá y II Región de Antofagasta (18° a 26° de latitud sur) (Frías *et al.*, 1998).

La importancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas permitió la introducción del Programa Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación de la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas., a través de la eliminación del principal vector, *T. infestans*, lo que permitió una disminución en la incidencia de nuevas infecciones en un 70% y el control efectivo del vector (Torres-Pérez *et al.*, 2011). El programa nacional del control del vector de la enfermedad de Chagas en Chile, impulsado por el Ministerio de Salud, se inicia en el servicio de salud Coquimbo en el año 1980, destinado a controlar al principal vector de la enfermedad de Chagas, *T. infestans*, a través de la aplicación de insecticidas en las casas del área comprendida entre la XV Región de Arica y Parinacota y la IV Región de Coquimbo, lo que permitió que para el año 1999 se alcanzara la meta de la interrupción de la transmisión vectorial de la infección por *T. cruzi*, a través de la disminución de la población del insecto vector (Lorca *et al.*, 2001).

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una descripción de la diversidad molecular de las poblaciones de *T. cruzi* circulando en territorio chileno a partir de vectores silvestres de *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* aislados de diferentes áreas de Chile, utilizando la secuenciación del gen para citocromo b. Este marcador molecular es altamente resolutivo y tiene la ventaja de que muchas secuencias de este gen están disponibles y son útiles para efectos comparativos (Brisse *et al.*, 2003; Marcili *et al.*, 2008; Marcili *et al.*, 2009; Spotorno *et al.*, 2008). En Chile solo TcI, TcII TcV y TcVI han sido documentados en el ciclo doméstico y silvestre (Coronado *et al.*, 2006; Coronado *et al.*, 2009; Galuppo *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras y extracción de DNA genómico.

Se trabajó con 41 cepas de *T. cruzi*, proporcionada por el laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, provenientes de insectos vectores del género *Mepraia* (*M. spinolai* y *M. gajardoi*) de diversas localidades de Chile a partir de cultivos y heces de los vectores (Tabla 1). De este conjunto de muestras fueron finalmente secuenciadas y analizadas un total de diecisiete, correspondiendo dieciséis de éstas a *T. cruzi* proveniente de *M. spinolai* y una a *T. cruzi* proveniente de *M. gajardoi* (Tabla 2). Epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivados en medio Diamond y suplementado con 10% de suero fetal bovino a 28 °C, según protocolo descrito (Diamond, 1968). El DNA genómico fue extraído utilizando el kit de extracción: E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit (Omega bio-tek).

2. Amplificación y secuenciación del gen para citocromo b.

Las secuencias del fragmento 5736-nt trckpmax de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (Ochs *et al.*, 1996), fue utilizada para diseñar los partidores dirigidos a amplificar el gen para citocromo b (Cyb): p18 (5'-GAC AGG ATT GAG AAG CGA GAG AG-3') y p20 (5'-CAA ACC TAT CAC AAA AAG CAT CTG-3') (Brisse *et al.*, 2003). Los primeros nucleótidos de los partidores p18 y p20 corresponden a la posición 949 y 1.670 de trckpmax, respectivamente (Barnabe *et al.*, 2003). La reacción en cadena de la polimera (PCR) se llevó a cabo en una reacción de 50µl que contiene: 25 pmols de cada partidor: (p18 y p20), 4U de Taq DNA polimerasa, el tampón suministrado con la enzima (KCL 50mM; Tris-CL 10 mM, Ph 8.8; Tritón X-100 0.1%; MgCL2 2,5 mM), 0,2 mM de cada dNTPs, agua bidestilada estéril y entre 2 y 5 µl de cada muestra. Como control positivo de amplificación se utilizó DNA obtenido de muestras previamente amplificadas de la cepa Sp 130 y como control negativo agua bidestilada estéril. La mezcla fue amplificada en un termociclador Pekin Elmer durante 35 ciclos (94° C, 1 min; 50° C, 30 s; 72° C, 90 s) seguida por una extensión final (7 min, 72° C) (Brisse *et al.*, 2003; Spotorno *et al.*, 2008). Finalmente, 15 µl de los productos amplificados fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tapón TBE 1%. Además, se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, Inc. USA). Al transiluminar el gel con luz ultravioleta, se determinó como positiva aquella muestra que evidenció la presencia de una banda de 700 pb, correspondiente al DNA del kinetoplasto de *T. cruzi* (Figura 1). El fragmento fue secuenciado en base a la ciencia química BigDye utilizando los mismos partidores previamente descritos mediante un servicio de secuenciación internacional (<http://www.macrogem.com>).

3. Análisis filogenético del gen para citocromo b.

Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa Bioedit 7.0.8.0 (Hall, 1999) y alineadas con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), implementada en Bioedit (Hall, 1999). Posterior al alineamiento, los sitios que mostraron sustituciones nucleóticas fueron re-examinados por inspección visual con los electroferogramas en dirección reversa y directa de cada fragmento. Los árboles filogenéticos fueron inferidos por máxima verosimilitud, utilizando la plataforma en línea PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003). Se realizó una búsqueda para el modelo de sustitución de DNA que mejor se ajusta a los datos, utilizando el criterio de información Akaike (Akaike, 1974) tal como se aplica en el programa jmodelTest 0.1.1 (Posada, 2008). El modelo seleccionado fue: GTR + G (G = 0.1130, -lnL = 3851.9282). El soporte de los nodos fue estimado por el método bootstrap de validación estadística (Felsenstein, 1985) con 1.000 réplicas usando PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003). Cincuenta cepas previamente secuenciadas se incluyeron en el análisis, de las cuales cuarenta y tres son originarias de Chile (Arenas *et al.*, 2011; Spotorno *et al.*, 2008), todas estas procedentes de la I Región de Tarapacá, II Región de Antofagasta y IV Región de Coquimbo, siete provenientes de otros países, incluida la cepa Marinkellei M1117 (Arenas *et al.*, 2011; Brisse *et al.*, 2000; Spotorno *et al.*, 2008) que se utilizó como grupo externo (Tabla 3).

RESULTADOS

De las 41 cepas de *T. cruzi* provenientes de insectos vectores del género *Mepraia*, fueron finalmente secuenciadas y analizadas un total de diecisiete. Correspondiendo 16 cepas a cultivos de epimastigotes y 1 cepa a heces de vector. El tamaño del amplicón resultante fue de 573 pb. Después de ser editadas, las longitudes de las secuencias de Cyb amplificadas por PCR alcanzaron los 516 pb. La secuenciación del locus para citocromo b resultó en diferentes haplotipos entre los 17 taxa de *T. cruzi* bajo estudio. La matriz de alineamiento de las secuencias del gen para Cyb para las 67 muestras (incluidas las 50 disponibles), mostraron 395 caracteres conservados y 113 sitios variables. De los sitios variables, 78 correspondieron a caracteres filogenéticamente informativos, es decir que nos permiten construir las relaciones filogenéticas entre cepas. La composición promedio de nucleótidos fue 47,56% de timina, 8,64% de citosina, 25,98% de adenina, y 17,81% de guanina; en relación a la composición de las secuencias individuales estas no tienen una diferencia sustancial de tal promedio. El árbol de Máxima verosimilitud (Fig. 1) muestra tres clados (clado A, clado B, clado C) con altos valores de bootstrap.

El clado A incluye la cepa TcI, el clado B a la cepa TcV-TcVI y clado C la cepa TcII. El clado A se presenta como un grupo constituido por dos subgrupos principales (subgrupo A₁ y subgrupo A₂). El subgrupo A₁ es estadísticamente significativo (bootstrap % = 77) y el subgrupo A₂ es estadísticamente significativo (bootstrap % = 100). El subgrupo A₁ es detectado en el “stock” de *T. cruzi* obtenidos en este estudio y el subgrupo A₂ fue descrito anteriormente en muestras sanguíneas de mamíferos (*Capra hircus* y *Octodon degus*) (Spotorno *et al.*, 2008).

Una situación similar existe en el “stock” del clado C. Al menos dos subgrupos de parásitos fueron detectados. El subgrupo C₁ es estadísticamente significativo (bootstrap % = 100) y el subgrupo C₂ es estadísticamente no significativo (bootstrap % = 59). El subgrupo mayor (C₁) y un subgrupo menor formado por las cepas Ivv, MxCh88, Vov y Tu18 (C₂). Por su parte la cepa Vtv se agrupa con el clon Esmeraldo de Brazil, aunque con bajo soporte estadístico (bootstrap % = 64).

Finalmente, el tercer clado B de *T. cruzi* que contiene el “stock” de cepas híbridas TcV y TcVI, todos agrupados entre sí. Este grupo es estadísticamente significativo (bootstrap % = 97).

DISCUSIÓN

La filogenia de las poblaciones de *T. cruzi* en Chile mediante secuenciación del gen para citocromo b, revela tres principales clados mitocondriales descritos previamente (de Freitas *et al.*, 2006): clado A correspondiente a *T. cruzi* I, clado B de los híbridos (en Chile sólo *T. cruzi* V y *T. cruzi* VI), y clado C exclusivo de *T. cruzi* II.

En el clado A dos principales grupos son detectados. Al respecto, trabajos previos realizados por otros métodos de genotipificación como hibridación de minicírculo mostró alta variación genotípica y baja variación genotípica por 1f8 y gp72 PCR-RFLP (Arenas *et al.*, 2011). Es interesante el análisis directo en muestras sanguíneas de mamíferos (*C. hircus* y *O. degus*), el cual reveló un subgrupo genéticamente distante de TcI que no se detectó en las poblaciones de este estudio (Spotorno *et al.*, 2008). La detección de un clon principal de *T. cruzi* mediante secuenciación del gen para citocromo b o hibridación de minicírculo es debido probablemente a la mayor selección de parásitos ocurrida durante el aislamiento y cultivo (Bosseno *et al.*, 2000). Al comparar este resultado con los encontrados en otros métodos de genotipificación basados en electroforesis enzimática de multilocus y análisis molecular de cariotipo, tras ser aplicados sobre una población equivalente, generan varias subdivisiones dentro de TcI (Barnabe *et al.*, 2001; Henriksson *et al.*, 1993; Solari *et al.*, 1998b; Venegas *et al.*, 1997). Esta observación

describe el alto poder de resolución de estos complejos métodos analíticos en relación con el utilizado en este estudio.

Por su parte, otros métodos de genotipificación como hibridación de minicírculo permite la diferenciación entre TcV y TcVI dentro del clado B, mediante la utilización de sondas DNA selectivas generadas de clones TcV y TcVI. Este resultado también es obtenido por 2 genes nucleares (1f8 y gp72) estudiado por PCR-RFLP. El marcador mitocondrial no diferencia entre TcV y TcVI dentro del clado B. Probablemente es un evento reciente de divergencia evolutiva de una línea híbrida con una cepa parenteral original, y dada la evolución del taxón para el gen de citocromo b, este no permite una clara distinción entre estos híbridos (Arenas *et al.*, 2011).

El clado C evidenció variación genotípica. Dos grupos de parásitos se detectan mediante secuenciación del gen para citocromo b, uno de los cuales es estadísticamente no significativo (C₂). Al respecto, trabajos previos realizados por otros métodos de genotipificación como hibridación de minicírculo mostró una agrupación idéntica, mediante 2 sondas DNA (CBB e IVV) (Arenas *et al.*, 2011). Además, estos subgrupos fueron previamente caracterizados por análisis molecular de cariotipo (Henriksson *et al.*, 1993;) y parecen ser los ancestros de TcV y TcVI (Westenberger *et al.*, 2006b).

Por su parte la cepa MxCh53 se aisló de un caso humano y fue mantenida en condiciones diferentes por tiempos variables: la cepa MxCh53r se mantuvo en pasajes sucesivos en ratones y posteriormente fue re-aislada en medio de cultivo agrupándose en el linaje TcI. La cepa MxCh53 I y MxCh53 mantenida en cultivo, se agrupó en el linaje TcI y TcII respectivamente (Torres *et al.*, 2004).

El análisis filogenético de todas las secuencias disponibles para citocromo b permite una clasificación y caracterización de la mayoría de los clados de *T. cruzi* y subgrupos descritos previamente, y la identificación y distinción de todas las cepas chilenas desde los reservorios (Spotorno *et al.*, 2008). Estos incluyen clados C y A, los cuales fueron los más divergentes en todos los árboles basados en secuencias para citocromo y datos de microsatélites (de Freitas *et al.*, 2006). Este hallazgo, junto con la comparación de dos secuencias completas de maxicírculo (Westenberger *et al.*, 2006a), y la reciente identificación de nuevos haplotipos de *T. cruzi* I (Cura *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2007) indican que todavía hay mucha variación genética por descubrir en la compleja variabilidad de genotipos ancestrales, particularmente entre los ancestros TcI de *T. cruzi*. Es importante mencionar que el "stock" de *T. cruzi* bajo estudio, fueron genotipos inequívocos mediante secuenciación del gen para citocromo b. Todos parecen estar formados por una mezcla homogénea de clones, aunque no fueron clonados en el

laboratorio antes del análisis. Esta homogeneidad de clones no es observada en *T. cruzi* de muestras biológicas que circulan en territorio chileno, ya que son infecciones mixtas (sobre el 40%), las que son frecuentes en hospederos vertebrados e invertebrados estudiados por hibridación de minicírculo (Coronado *et al.*, 2006; Coronado *et al.*, 2009). Se ha descrito que procesos como el aislamiento y cultivo desde una mezcla de *T. cruzi*, favorecen la selección y permanencia de algunos clones después de un cultivo prolongado (Bosseno *et al.*, 2000). Algunas limitaciones presenta el marcador molecular utilizado en este estudio. El límite umbral mínimo de detección es 5 parásitos/ensayo, por consiguiente es poco apropiado para estudios epidemiológicos que contengan mezclas de *T. cruzi* en baja cantidad.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se ratifica que los UDTs circulando en el ciclo transmisión silvestre son TcI, TcII, TcV y TcVI. Además demuestra que los UDTs TcI y TcII son genotípicamente heterogéneos y TcV y TcVI son genotípicamente homogéneos. Sin embargo algunas técnicas de caracterización molecular presentan un mayor poder de resolución que la secuenciación del gen para citocromo b. Por lo tanto, es importante seleccionar las herramientas moleculares apropiadas para determinar UDTs en poblaciones de *T. cruzi*, mediante el “stock” de parásitos o directamente de muestras biológicas. Futuros estudios deberían incluir otros marcadores nucleares con mayor poder de resolución para evaluar sus ventajas con fines taxonómicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT 1085154, Chile).

BIBLIOGRAFÍA

AKAIKE, H. 1974. "A new look at the statistical model identification". IEEE Trans. Automat. Contr. 19 (6): 716–723.

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.

ANÓNIMO. 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1): 429–432.

ARENAS, M.; CAMPOS, R.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; SOLARI, A. 2011. *Trypanosoma cruzi* genotypes of insect vectors and chagasic patients of Chile studied by means of cytochrome b gene sequencing, minicircle hybridization and nuclear genes polymorphism. Vector Borne Zoonotic Dis (en publicación).

ATÍAS, A. 1998. Enfermedad de Chagas. En: Parasitología Médica. Atías, A. Primera edición. Ed. Mediterráneo. Santiago. Chile. 251-264.

AVILA, H.; SIMPSON, L. 1995. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. RNA. 1:939–947.

BARNABÉ, C.; NEUBAUER, K.; SOLARI, A.; TIBAYRENC, M. 2001. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. Acta Trop. 78:127-37.

BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus Schizotrypanum based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence. Infect. Genet. Evol. 2: 201– 208.

BOSSENO, F.; YACSIK, N.; VARGAS, F.; BRENIÈRE, S. 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95:601-607.

BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100(3): 237-239.

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

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. 2001. Characterisation of large and small Subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31:1218–1226.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E.; BERKVEN, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M.; BUCK, G.; DUJARDIN, J.; TIBAYRENC, M. 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2:173–183.

CAMPBELL, D.; WESTENBERGER, S.; STURM, N. 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr. Mol. Med.* 2004; 4:549–562.

CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ALBRECHT, H.; ROZAS, M.; APT, W.; ORTIZ, S.; RODRÍGUEZ, J.; SANCHEZ, G.; SOLARI, A. 2006. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74:1008-12.

CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2009. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmission cycle: the evaluation in the sylvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81:656-659.

CURA, CI.; MEJÍA-JARAMILLO, A.; DUFFY, T.; BURGOS, J.; ET AL. 2010. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int. J. Parasitol.* 40:1599-1607.

DE FREITAS, J.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMIENTA, J.; BASTO-RODRIGUES, L.; GONZALVES, V.; TEIXEIRA, S.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.; MACHADO, C.; PENA, S. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2:0226–0235.

DIAMOND, L. 1968. Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae with trypanosomatids. *J. Parasitol.* 54:715-719.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.; CASTRO, J.; PEREIRA, J.; FERNANDES, C.; JUNQUIRA, A.; NAIFF, R.; BARRETT, T.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.; COURA, J. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using miniexon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:807–811.

FORATTINI, O.; FERREIRA, O.; ROCHA E SILVA, E.; ROBELLO, E.; SANTOS, J. 1971. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. II Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. *Rev. Saúd. Púb.* 5:163-191.

FRÍAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C. 1998. *Mepraia gajardo*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71:177-188.

GALUPPO, S.; BACIGALUPO, A.; GARCÍA, A.; ORTIZ, S.; CORONADO, X.; CATTAN, P.; SOLARI. 2009. Predominance of *Trypanosoma cruzi* genotypes in two reservoirs infected by sylvatic *Triatoma infestans* of an endemic area of Chile. *Acta Trop.* 111:90-93.

GAUNT, M.; YEO, M.; FRAME, I.; STOTHARD, J.; CARRASCO, H.; TAYLOR, M.; MENA, S.; VEAZEY, P.; MILES, G.; ACOSTA, N.; DE ARIAS, A.; MILES, M. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 421: 936–939.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52(5):696-704.

HALL, T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acid. S.* 41, 95–98.

HENRIKSSON, J.; PETERSSON, U.; SOLARI, A. 1993. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* 77:334-48.

HERRERA, C.; BARGUES, M.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; VALLEJO, G.; GUHL, G. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 7:535–539.

LENT, H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. 1994. Revalidação de gênero *Mepraia* Mazza, Gajardo and Jorg, 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89: 347-352.

LESCURE, F-X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. 2010. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet. Infect. Dis.* 10:556-570.

LORCA, M.; GARCIA, A.; BAHAMONDE, M.; FRITZ, A.; TASSARA, R. 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev. Med. Chile.* 129:264-69.

MARCILI, A.; VALENTE, V.; VALENTE, S.; JUNQUEIRA, A.; DA SILVA, F.; PINTO, A.; NAIFF, R.; CAMPANER, M.; COURA, J.; CAMARGO, E.; MILES, M.; TEIXEIRA, M. 2008. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39(5):615-23.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V.; VALENTE, S.; BATISTA, J.; JUNQUEIRA, A.; SOUZA, A.; DA ROSA, J.; CAMPANER, M.; LEWIS, M.; LLEWELLYN, M.; MILES, M.; TEIXERA, M. 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.* 9:1265-1274.

NOIREAU, N.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 40: 26.

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.

POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.

RASSI, A, JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. 2010. Chagas disease. *Lancet.*375:1388-402.

SOLARI, A.; LORCA, M.; CONTRERAS, M.; GARCIA, A.; SALINAS, P.; ORTIZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; SCHENONE, H. 1998a. Rendimiento del xenodiagnóstico y el PCR para evaluar el tratamiento quimioterápico específico de la enfermedad de Chagas en niños. *Bol. Chile. Parasitol.* 53:27-29.

SOLARI, A.; WALLACE, A.; ORTIZ, S.; VENEGAS, J.; SANCHEZ, G. 1998b. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp. Parasitol.* 89: 312-22.

SOUTO, R.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.; CAMPBELL, D.; ZINGALES, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 83: 141–152.

SPOTORNO, A.; CORDOVA, L.; SOLARI, A. 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. Infect. Genet. Evol. 8:898–900.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic. Acids. Res. 22:4673-4680.

TIBAYRENC, M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int. J. Parasitol. 28:85–104.

TORRES, J.; ORTIZ, S.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A. 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. Parasitology. 128: 161-8.

TORRES-PÉREZ, F.; ACUÑA-RETAMAR, M.; COOK, J.; BACIGALUPO, A.; GARCÍA, A.; CATTAN, P. 2011. Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: Testing biogeographic hypotheses of dispersal. Infect. Genet. Evol. 11:167–174.

VENEGAS, J.; ORTIZ, S.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A. 1997. Molecular karyotype and schizodeme analyses of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean triatomines. Parasitology. 115:41-46.

WESTENBERGER, S.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.; STURM, N. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 171:527–543.

WESTENBERGER, S.; CERQUEIRA, G.; EL-SAYED, N.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.; STURM, N. 2006a. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. BMC Genomics. 22: 7:60.

WESTENBERGER, S.; STURM N.; CAMPBELL D. 2006b. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. Int. J. Parasitol. 337-346.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.; BRIONES, M.; CAMPBE, D.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F. ET AL. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104: 1051-1054.

Tabla 1: Número de muestras analizadas de Chile, correspondiente a un total de 41 cepas de las cuales 17 fueron secuenciadas. Se especifica el hospedero, región de origen, nombres de las cepas, número de muestras y cantidad de cepas secuenciadas.

Hospedero	Región de Chile	Cepa ^a	Número de muestras	Muestras secuenciadas
<i>M. gajardoi</i>	XV Región de Arica y Parinacota	2v, 4v, 8v, 9v, 12v, 15v, 2c, 3c, 4c, 8c, 9c, 10c, 12c, 13c, 14c, 29c, Gaj 29.	17 ^b	1
<i>M. spinolai</i>	III Región de Atacama	Sp Inca	1 ^c	1
<i>M. spinolai</i>	IV Región de Coquimbo	Sp 54, Sp All, Sp Comb 2, Sp 161, Sp 104, Sp 31, Sp Guayacan, Sp 130, Sp Comb A1, Sp Trans, SpA1, Sp161, Sp 4.	13 ^c	10
<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana	Sp col 2, Sp Ti9, Sp Col 108, Sp Til 70, Sp 153, Spti1, Col 82,T”T” 100, Sp col 18, Sp col 70	10 ^c	5
Total			41	17

^a Código originales de aislados

^b Muestras de heces de vectores

^c Muestras de Cultivos de epimastigotes

M. spinolai, *Mepraiia spinolai*; *M. gajardoi*, *Mepraiia gajardoi*.

Tabla 2. Cepas de *T. cruzi* de Chile, perteneciente al ciclo de transmisión silvestre y que fueron amplificadas, purificadas y secuenciadas. Se especifica el nombre de la cepa, hospedero, origen geográfico y número de acceso en GenBank de las secuencias empleadas en este estudio.

Cepa ^a	Hospedero	Localidad	GenBank número de acceso ^b
Gaj 29	<i>M. gajardoi</i>	XV Región, Arica	JF267933
Sp Inca	<i>M. spinolai</i>	III Región, Inca de Oro	JF267930
Sp 54	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Bellavista	JF267928
Sp All	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Flor del Valle	JF267930
Sp Comb 2	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Combarbalá	JF267930
Sp 161	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Combarbalá	JF267930
Sp 104	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Ramadilla	JF267930
Sp 31	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Flor del Valle	JF267930
Sp Guayacan	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Guayacan	JF267930
Sp 130	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Ramadilla	JF267930
Sp Comb A1	<i>M. spinolai</i>	IV Región, Combarbalá	JF267930
Sp Trans	<i>M. spinolai</i>	IV Región, El Transito	JF267930
Sp col 2	<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana, Colina	JF267928
Sp Col 108	<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana, Colina	JF267930
Sp Ti9	<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana, Til Til	JF267930
Sp Til 70	<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana, Til Til	JF267934
Sp 153	<i>M. spinolai</i>	Región Metropolitana	JF267929

^a Código originales de aislados.

^b Secuencias determinadas en este estudio y depositada en GenBank.
M. spinolai, *Mepraia spinolai*; *M. gajardoi*, *Mepraia gajardoi*.

Tabla 3: Muestras disponibles en GenBank para citocromo b de *T. cruzi*, correspondiente a un total de 50 cepas de las cuales 37 secuencias fueron determinadas en este estudio para su publicación y 13 determinadas en otros estudios. Se muestra el nombre publicado de la cepa, su clasificación internacional, hospedero del cual se obtuvo, país, localidad de origen y número de acceso en GenBank de las secuencias.

Cepa ^a	Linaje	Hospedero	País	Localidad	GenBank ^b
Vmv3 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	I Región, Francia-Iquique	JF267930
Viqui ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	I Región, Quistagama-Iquique	JF267930
Vgm ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	I Región, Iquique	JF267938
V115 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267930
V111 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267930
P Coyo-3 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267930
Peine ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267930
Sab108 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267939
Ap ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	II Región, El Salvador	JF267938
A04.F	<i>T. cruzi</i> I	<i>M. spinolai</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559323.1
24T-P18	<i>T. cruzi</i> I	<i>C. hircus</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559324.1
26T-P18	<i>T. cruzi</i> I	<i>C. hircus</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559326.1
5-P18	<i>T. cruzi</i> I	<i>C. hircus</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559329.1
58-P18	<i>T. cruzi</i> I	<i>O. degus</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559327.1
54-P18	<i>T. cruzi</i> I	<i>O. degus</i>	Chile	IV Región, Illapel ^d	EU559328.1
Lq ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	IV Región, La Isla	JF267930
MxCh53r ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	IV Región, Tulahuén.	JF267930
MxCh53 I ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	IV Región, Tulahuén.	JF267937
Xd 96 ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	IV Región, Illapel	JF267938
Lgn ^c	<i>T. cruzi</i> I	Humano	Chile	IV Región, Limari	JF267928
V10p ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Perú	Valle de Vítor, Arequipa.	JF267928
V15p ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. infestans</i>	Perú	Valle de Vítor, Arequipa.	JF267928
862039 ^c	<i>T. cruzi</i> I	<i>D. marsupialis</i>	Bolivia	Sin información	JF267940
Vtv ^c	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. infestans</i>	Chile	I Región, Iquique	JF267932
Mcv ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Tulahuén.	JF267929
MxCh 88 ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Cuncumesi-Limari	JF267931
MxCh 53 ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Chañaral Alto-Limari	JF267929
XhCh 80 ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Chañaral-Limari	JF267929

MxCh 46 ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Salamanca Choapa	JF267929
Ivv ^c	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Limari	JF267931
V1738 ^c	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. infestans</i>	Chile	IV Región, Las Ramadas de Tulahuén	JF267929
MCH3 ^c	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. infestans</i>	Chile	IV Región, Anayan-Limari	JF267929
Vov ^c	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. infestans</i>	Chile	IV Región, Ovalle-Limari	JF267931
CBB cl3	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Chile	IV Región, Tulahuén	AJ439722.1
Esmeraldo cl3	<i>T. cruzi</i> II	Humano	Brasil	Bahía	AJ130931.2
Tu18 cl2	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. infestans</i>	Bolivia	Tupiza	AJ130932.2
Xd 189 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Choapa	JF267933
Xd 103 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Choapa	JF267935
Xd 141 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Choapa	JF267933
Xd 97-98 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Choapa	JF267933
Xd 143 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Choapa	JF267936
Cee ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Chillepín	JF267933
Nt 1 ^c	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Chillepín	JF267933
MN cl2	<i>T. cruzi</i> V	Humano	Chile	IV Región, Illapel	EU559325.1
Vcf ^c	<i>T. cruzi</i> V	<i>T. infestans</i>	Chile	IV Región, San Félix	JF267933
CH2 ^c	<i>T. cruzi</i> VI	<i>T. infestans</i>	Chile	II Región, San Pedro de Atacama	JF267933
F06.V195	<i>T. cruzi</i> VI	<i>T. infestans</i>	Chile	IV Región	EU559322.1
Tulahuén cl2	<i>T. cruzi</i> VI	Humano	Chile	IV Región, Tulahuén.	AJ130936.2
2675-1 ^c	<i>T. cruzi</i> VI	<i>C. porcellus</i>	Argentina	Salta	JF267933
M1117	<i>T. cruzi</i> marinkellei	<i>P. hastatus</i>	Brasil	Para	AJ130927.2

^a Código originales de aislados.

^b Secuencias depositadas en GenBank.

^c Secuencias determinadas en este estudio para su publicación y depositadas en GenBank (Arenas *et al.*, 2011).

^d Reserva Nacional Las Chinchillas, Aucó, IV Región.

M. spinolai, *Mepraia spinolai*; *C. hircus*, *Capra hircus*; *O. degus*, *Octodon degus*; *T. infestans*, *Triatoma infestans*; *D. marsupialis*, *Didelphis marsupialis*; *C. porcellus*, *Cavia porcellus*; *P. hastatus*, *Phyllostomum hastatus*.

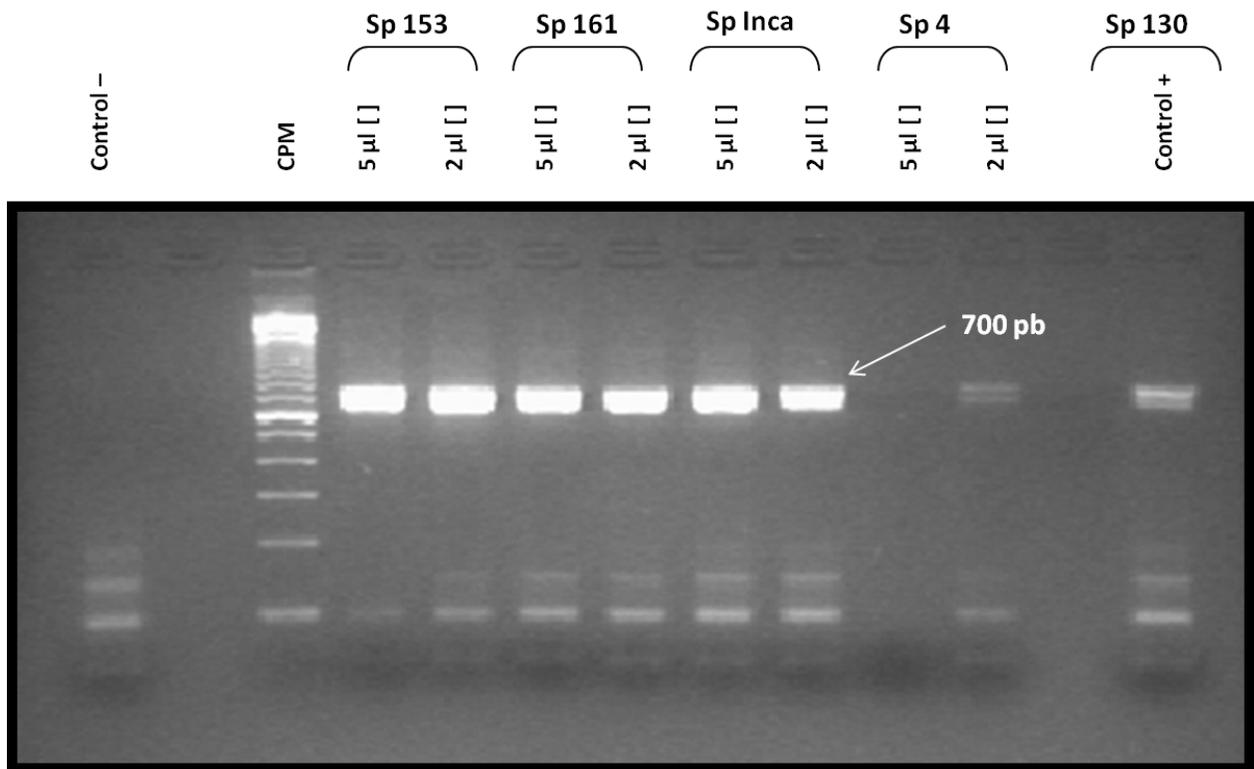


Figura 1: Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa (1,2 %) de los productos de amplificación obtenidos por PCR a partir del DNA de *T. cruzi*. La reacción en cadena de la polimerasa se llevo a cabo en una reacción de 50 µl que contiene 5 µl y 2 µl de muestra respectivamente. La flecha indica el fragmento de amplificación de 700 pb; Sp 153 (5 µl y 2 µl): muestra positiva; Sp 161 (5 µl y 2 µl): muestra positiva; Sp inca (5 µl y 2 µl): muestra positiva; Sp 4 (5 µl y 2 µl): muestra negativa y positiva respectivamente; Control -: control negativo; Control +: control positivo; CPM: control de peso molecular.

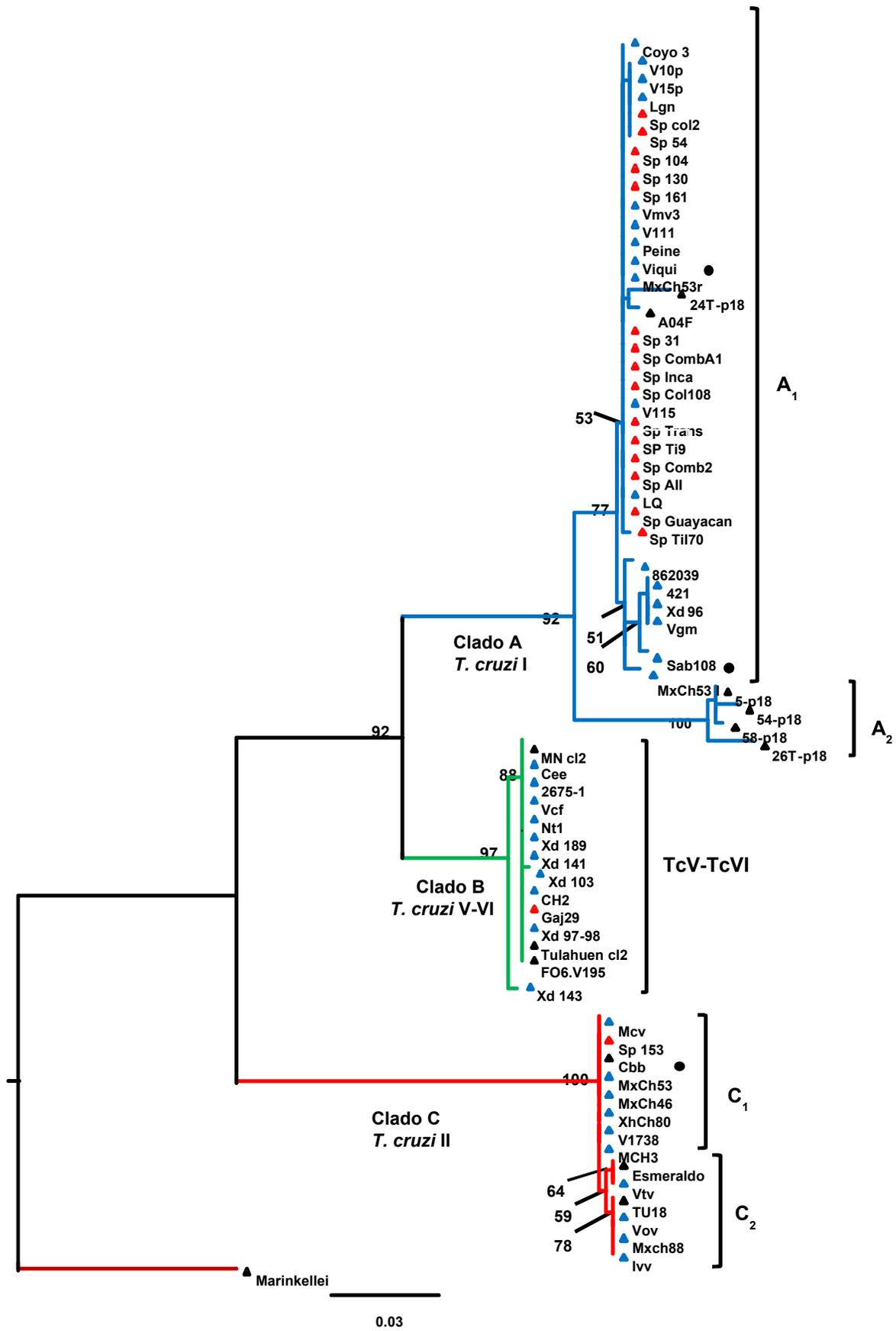


Figura 1: Relaciones filogenéticas de *T. cruzi* basados en la secuencia del gen para citocromo b. Topología del árbol filogenético obtenido a través del método de Máxima verosimilitud (Maximum likelihood) analizando todos los taxa (67), inferido con el modelo GTR + G (G = 0.1130, -lnL = 3851.9282). Los números sobre los nodos, representan valores (en porcentaje) del bootstrap de 1.000 replicas. TcI, TcII, TcV y TcVI: Genotipos de *T. cruzi* I, II, V Y VI respectivamente. A, B: Subgrupos dentro de genotipos. El árbol se presenta a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para deducir el árbol filogenético. El símbolo ▲ indica las cepas que pertenecen a muestras procedentes de *M. spinolai* y *M. gajardoi* secuenciadas en el presente estudio; Los símbolo ▲ y ▲ indican las secuencias determinadas en este estudio para su publicación (Arenas et al., 2011); El símbolo ▲ indica secuencias determinadas en otros estudios (Brisse et al., 2003; Marcili et al., 2008; Marcili et al., 2009; Spotorno et al., 2008); El símbolo ● es una cepa MxCh53 que se aisló de un caso humano y fue mantenida en condiciones diferentes por tiempos variables: la cepa MxCh53r se mantuvo en pasajes sucesivos en ratones y posteriormente fue re-aislada en medio de cultivo (resultando seleccionada TcI). La cepa MxCh53 I y MxCh53 mantenida en cultivo, resultó seleccionada TcI y TcII respectivamente.