



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



“ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES DE LAS POBLACIONES  
DE *Trypanosoma cruzi* PRESENTES EN *Triatoma infestans* Y SU  
RELACIÓN GENÉTICA CON POBLACIONES  
DETECTADAS EN PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS”

**Tamara Rojas Gajardo**

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

PROFESOR GUÍA: DR. JUAN VENEGAS HERMOSILLA

SANTIAGO, CHILE

2012

Financiado por FONDECYT  
N° 1070837

## ÍNDICE

Capítulos	Página
Resumen	1
Summary	2
1. Introducción	3
2. Revisión bibliográfica	4
2.1. La enfermedad de Chagas	4
2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
2.3. Características de las poblaciones de <i>T. cruzi</i>	7
2.4. Técnicas moleculares	9
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1. Poblaciones de <i>Trypanosoma cruzi</i> estudiadas	11
3.2. Muestras de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
3.3. Análisis de marcadores microsatélites	12
3.4. Determinación de linajes de clones predominantes de <i>T. cruzi</i>	15
3.5. Análisis estadístico	15
3.6. Análisis filogenético	16
4. Resultados	17
5. Discusión	26
6. Conclusiones	30
7. Bibliografía	31
Anexos	

## ÍNDICE

Tablas	Página
Tabla 1. Comparación entre pares de poblaciones de <i>T. cruzi</i> en base a las frecuencias alélicas de clones predominantes, según locus analizado y su significancia estadística.	20
Tabla 2: Diferenciación genética entre pares de poblaciones de <i>T. cruzi</i> en base a las frecuencias alélicas de los clones predominantes y su significancia estadística	21
Tabla 3. Frecuencia y distribución de linajes de <i>T. cruzi</i> en clones predominantes detectados en triatomínicos de tres regiones endémicas, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos chilenos.	23
Tabla 4. Comparación de linajes de clones predominantes de <i>T. cruzi</i> , detectados en muestras de triatomínicos de tres regiones endémicas de Chile, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos, y su significancia estadística.	24
Tabla 5. Frecuencia del número de clones de <i>T. cruzi</i> detectados en los distintos tipos de muestras (triatomínicos, sangre y xenodiagnóstico).	25

## RESUMEN

El protozooario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una zoonosis parasitaria transmitida por insectos triatomínicos. En Chile, los vectores triatomínicos *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* se encuentran, respectivamente, asociados a los ciclos doméstico y silvestre de transmisión de la enfermedad. Actualmente existen reportes de la presencia de *T. cruzi* en *Mepraia gajardoi*, sugiriendo que esta especie de triatomo participaría en el ciclo de transmisión silvestre.

Las poblaciones naturales de *T. cruzi* estarían compuestas de múltiples clones distribuidos en seis unidades discretas de tipificación (DTUs) o linajes. Se ha reportado que, a diferencia de lo que ocurre en hospederos vertebrados, adaptaciones genéticas en hospederos invertebrados favorecerían en ellos la multiclonalidad de *T. cruzi*.

El objetivo de este trabajo fue identificar los clones de *T. cruzi* presentes en muestras de contenido intestinal de *T. infestans* provenientes de Atacama (III), Valparaíso (V) y Región Metropolitana (RM) y determinar si algunos de estos clones corresponden a los detectados previamente en pacientes chagásicos crónicos. Con este fin se aplicó el método de análisis de marcadores microsatélites a muestras de *T. cruzi* provenientes de 109 triatomínicos y los resultados se compararon con información ya publicada de 80 muestras de *T. cruzi* provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos de Chile.

Las frecuencias alélicas obtenidas permitieron detectar diferencias genéticas significativas. Luego, a partir de un análisis filogenético se constituyeron tres nodos de parentesco: (a) clones provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes, (b) clones provenientes de triatomínicos de las regiones III, V y RM, y (c) clones descritos en literatura; los clones de cada nodo se habrían originado a partir de un ancestro común. En cuanto a frecuencia y distribución de linajes de *T. cruzi*, la mayor cantidad de muestras, provenientes tanto de triatomínicos de las tres regiones (59,4%) como de sangre y xenodiagnóstico de pacientes (82% y 84,3%, respectivamente), pertenecían al linaje TcI. El linaje H (híbrido) se detectó en muy escaso porcentaje de muestras de sangre y no se detectó en xenodiagnóstico de pacientes. Respecto de la clonalidad, las muestras de *T.*

*cruzi* procedentes de triatomíneos resultaron ser principalmente multiclonales, en cambio aquellas tanto de sangre como de xenodiagnóstico de pacientes chagásicos correspondían principalmente a muestras uniclonales. De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo concluir que las poblaciones de *T. cruzi* detectadas en los triatomíneos estudiados eran genéticamente diferentes a las detectadas previamente en pacientes chagásicos crónicos.

## SUMMARY

The protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the etiologic agent of Chaga's disease which is a parasitic zoonoses transmitted by triatomine bugs commonly known as kissing bugs. In Chile, the triatomine vectors *Triatoma infestans* and *Mepraia spinolai* are associated with the domestic and wild transmission cycles of the disease, respectively. *Mepraia gajardoi* has also been reported as a *T. cruzi* host, therefore this triatomine species could also being associated with the sylvatic transmission cycle.

Natural populations of *T. cruzi* are composed by multiples clones clustered in six discrete typing units (DTUs) or *T. cruzi* lineages. Reports about genetic adaptations of *T. cruzi* to their hosts support the multiclonality in the invertebrate in contrast to vertebrate hosts.

The purpose of this work was to identify *T. cruzi* clones or clonal mixtures in gut samples of *T. infestans* from the Atacama (III), Valparaiso (V) and the Metropolitan Region (RM) of Chile, and to establish if some of these clones correspond to that detected in chagasic chronics patients. To do it, 109 *T. cruzi* samples obtained from triatomines were analysed by the microsatellite markers analysis method and the results were compared with published information about 80 *T. cruzi* samples from blood and xenodiagnosis of chilean chagasic chronic patients.

The allelic frequencies analysis showed significative differences between the studied populations. The phylogenetic analysis allowed us to establish three nodes, one of them included *T. cruzi* clones from patient's blood and xenodiagnosis; another one, the clones from triatomines of III, V and MR regions, and a third node constituted by clones described in the literature. The clones in each node could be originated from a common ancestor. In terms of *T. cruzi* frequency and lineage distribution most of samples from the three region's triatomines (59.4%) and from patient's blood and xenodiagnosis (82% and 84.3%, respectively) belonged to the Tc1 lineage, while the H (hybrid) lineage was only detected in a very low percentage of blood samples, and was not detected in patient's xenodiagnosis. Regarding to clonality, the *T. cruzi*'s triatomine samples were found to be mainly multiclonal, however those samples from chagasic patients blood and

xenodiagnosis were both mainly monoclonal. According to these results, we concluded that these *T. cruzi* populations were genetically different.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, una zoonosis parasitaria transmitida por insectos triatominos y considerada la de mayor morbilidad y mortalidad en el continente americano, según la Organización Mundial de la Salud.

En Chile, se han descrito tres especies de triatominos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*. Clásicamente, *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* se comportan como vectores de *T. cruzi*, sin embargo actualmente se ha demostrado la presencia de este protozoo parásito en *M. gajardoi*, lo cual lo sugiere como un tercer vector a estudiar.

Por otra parte, se ha establecido que la reproducción de *T. cruzi* es fundamentalmente clonal, describiéndose seis linajes para esta especie, con una gran variabilidad genética posiblemente relacionada con aspectos biológicos aún desconocidos.

A través de diversas metodologías, se ha demostrado que muestras de *T. cruzi* aisladas de vectores tienen una composición clonal más compleja que aquellas provenientes de pacientes chagásicos en fase aguda o crónica de la enfermedad. Esto podría indicar un proceso de selección en el hospedero humano, que limitaría el número de clones sobrevivientes después de la infección. Sin embargo, una suerte de selección clonal podría ocurrir durante el aislamiento del parásito a partir de sangre o xenodiagnóstico, para ser mantenido *in vitro*. Así, los parásitos obtenidos de cultivo para caracterización molecular podrían ser diferentes de aquellos presentes en el hospedero infectado.

En humanos, se ha descrito el desarrollo de una forma aguda de la enfermedad de Chagas, una fase indeterminada o latente y una forma crónica, siendo esta última la más observada comúnmente y que se caracteriza por la presentación de afecciones cardíacas y digestivas.

De acuerdo a los antecedentes aquí presentados, el propósito de este estudio fue identificar los diversos clones de *T. cruzi* presentes en el vector *T. infestans*, a partir de muestras obtenidas en el marco del Programa de Erradicación de la Infestación

Domiciliaria de *T. infestans* del Ministerio de Salud de Chile y determinar si algunos de estos clones correspondían a los detectados en pacientes chilenos chagásicos crónicos. Con este fin se utilizó un método de análisis basado en marcadores microsatélites, dada su sensibilidad y reproducibilidad previamente descritas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 La enfermedad de Chagas

Se estima que en América Latina alrededor de 15 millones de personas estarían infectadas con *T. cruzi*, determinándose una mayor prevalencia para la infección adquirida mediante vectores en áreas rurales y periurbanas. La distribución de la enfermedad de Chagas no es homogénea, ya que depende de la presencia del vector domiciliario y de que las condiciones de la vivienda faciliten el contacto entre el vector y el hospedero humano (Acha y Szyfres, 2003).

Los insectos vectores de *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, se distribuyen a nivel mundial entre las latitudes 42° Norte y 43° Sur (PAHO, 1994).

En Chile, el área endémica de esta parasitosis comprende, por distribución natural de los vectores, sectores rurales y peri-urbanos, desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del Libertador General Bernardo O'Higgins. Entre ellas, las regiones de Atacama y Coquimbo son consideradas hiperendémicas (Schenone *et al.*, 1991).

Los vectores de *T. cruzi* son insectos hematófagos triatominos (Figura 1) pertenecientes al orden Hemiptera, llamados comúnmente vinchucas en nuestro país. En Chile se encuentran las especies de triatominos *T. infestans*, *M. spinolai* y *M. gajardoi*, siendo *T. infestans* y *M. spinolai* los vectores que clásicamente se encuentran asociados a los ciclos de transmisión doméstico y silvestre, respectivamente, de la enfermedad (Apt y Reyes, 1990). Sin embargo, en la actualidad existe evidencia de la presencia de *T. cruzi* en *M. gajardoi*, aunque no se ha descrito aún como vector (Botto-Mahan *et al.*, 2008).



**Figura 1. Imagen del insecto hematófago *Triatoma infestans*, vector domiciliario de la enfermedad de Chagas ([http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna\\_kaplinsky](http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna_kaplinsky))**

El hospedero humano adquiere la infección por *T. cruzi*, generalmente a través de las heces de triatomíneos infectados depositadas en la piel mientras el vector se alimenta, pero también puede adquirirla por transfusión de sangre contaminada, por transmisión congénita desde madres infectadas o, más raramente, por trasplante de órganos, comida contaminada o accidentes de laboratorio (Macedo *et al.*, 2002).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar un curso clínico variable, dentro del cual se puede distinguir tres fases: aguda, indeterminada y crónica.

La fase aguda es generalmente asintomática, sin embargo un 5% de los pacientes podría presentar fiebre, náuseas y linfadenopatía. Esta fase se extiende por dos a tres meses y en ella se produce una intensa proliferación del parásito. Durante la fase indeterminada o latente existe evidencia parasitológica y/o serológica de la presencia de *T. cruzi* y alrededor de un 25 a 30% de estos casos desarrollarán la forma crónica de la enfermedad, caracterizada por la presentación de afecciones cardíacas y gastrointestinales (Macedo *et al.*, 2004). Esta última fase puede desarrollarse después de 10 años de adquirida la infección o bien no presentarse nunca.

El genotipo infectante de *T. cruzi* puede ser un factor importante en la determinación de la manifestación clínica de la enfermedad (Miles *et al.*, 1981), ya sea en su presentación cardíaca que cursa con miocarditis crónica, la que frecuentemente lleva a cardiomegalia, falla cardíaca congestiva y arritmias, o en su presentación digestiva que incluye megaesófago y/o megacolon en casos avanzados (Apt, 1991). En pacientes crónicos, la parasitemia (presencia de parásitos en la sangre) es bastante menor a la observada en la fase aguda, siendo muchas veces indetectable por métodos parasitológicos de recuento (Campos *et al.*, 2007).

A partir del año 1991, en el marco de la "Iniciativa en Salud de los Países del Cono Sur" (INCOSUR) para el control de la enfermedad de Chagas, en Chile se implementó el Programa Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación de la transmisión vectorial y transfusional de esta enfermedad, certificándose la interrupción de la transmisión vectorial a lo largo del territorio endémico chileno desde el año 1999 (WHO, 2000).

## 2.2 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (Figura 2) es un parásito protozooario perteneciente al orden *Kinetoplastida*, de la familia *Trypanosomatidae*. Posee un único flagelo y una mitocondria, cuyo genoma forma una estructura compleja y compacta en forma de red que recibe el nombre de kinetoplasto. *T. cruzi* posee un genoma nuclear esencialmente diploide (Macedo *et al.*, 2002) y su reproducción es mayoritariamente clonal, aunque existe evidencia de algunos eventos, pero raros, de recombinación genética (Tibayrenc, 2003; Machado y Ayala, 2001; Gaunt *et al.*, 2003). Cada clon representa un linaje que se reproduce por división binaria y permanece inalterado por un gran número de generaciones hasta la ocurrencia de mutaciones (Tibayrenc y Ayala, 1991; Brisse *et al.*, 2000).



**Figura 2. Imagen de *T. cruzi* rodeada por glóbulos rojos, obtenida por microscopia electrónica de barrido. ([http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap23/23-22\\_Trypanosoma.jpg](http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap23/23-22_Trypanosoma.jpg))**

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* adopta diferentes formas que se diferencian por la posición relativa del kinetoplasto en relación con el núcleo celular y la emergencia del flagelo, dependiendo de si se encuentra en un hospedero invertebrado o vertebrado y de si se encuentra en el torrente sanguíneo o dentro de las células del hospedero vertebrado. Este parásito puede hospedarse en varios mamíferos, entre ellos, el ser humano, animales domésticos (caninos, felinos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos y conejos) y animales silvestres (roedores, primates, marsupiales y edentados) (Apt y Reyes, 1990; Wendell *et al.*, 1992; Rozas *et al.*, 2007).

### 2.3 Características de las poblaciones de *T. cruzi*

Hasta hace algún tiempo, se consideraba que las poblaciones naturales de *T. cruzi* estaban compuestas de múltiples clones distribuidos en dos linajes filogenéticos principales, los que exhibían rasgos biológicos diferentes (Barnabé *et al.*, 2000). Estos correspondían a los linajes filogenéticos TcI y TcII (Brisse *et al.*, 2000).

En base a estudios realizados mediante amplificación al azar de DNA (RAPD) y perfiles isoenzimáticos, se propuso subdividir el linaje TcII en cinco sublinajes, denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU). Luego se determinó que el linaje TcI correspondía a DTU 1, y que dentro del linaje TcII se podía diferenciar al DTU 2a, DTU 2b, DTU 2c, DTU 2d y DTU 2e, también denominados TcIIa al TcIIe (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000). La fusión entre TcI y TcIIb habría originado los sublinajes TcIIa y TcIIc y la fusión entre los sublinajes TcIIb y TcIIc originaría los sublinajes híbridos (H) TcIIId y TcIIe (Machado y Ayala, 2001; Gaunt *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos sugerían que los clones pertenecientes al linaje TcI se encontraban asociados al ciclo silvestre de transmisión de la enfermedad de Chagas y los clones pertenecientes al linaje TcII, al ciclo doméstico de transmisión (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000). Actualmente, como resultado del último consenso para unificar la nomenclatura sobre la filogenia de *T. cruzi*, la nueva denominación para los seis DTUs previamente descritos, corresponde a: TcI (DTU1), TcII (DTU2b), TcIII (DTU2c), TcIV (DTU2a), TcV (DTU2d) y TcVI (DTU2e) (Zingales *et al.*, 2009).

Se ha postulado que en hospederos vectores podría ocurrir la formación de poblaciones multiclonales (compuestas por dos o más clones) de *T. cruzi*, debido a que los pacientes en áreas endémicas pueden estar infectados por múltiples contactos con diferentes triatomíneos y éstos, a su vez, pueden alimentarse de diferentes individuos infectados. Lo anterior explicaría el aislamiento de cepas multiclonales en cultivo (Macedo *et al.*, 2002). Estas poblaciones multiclonales complejas se propagan asexualmente y difieren entre ellas tanto en sus características genéticas y biológicas como en su comportamiento en hospederos vertebrados (Rozas *et al.*, 2007).

El origen geográfico del insecto vector influiría en la selección de las características genéticas de la población de *T. cruzi* que hospeda, pues diferentes regiones difieren en clima, reservorios de mamíferos y población humana (Rozas *et al.*, 2007). Además, distancia y barreras geográficas pueden limitar el desplazamiento del vector y el flujo génico entre poblaciones de triatominos, propiciando la estructuración de poblaciones y diferenciación genética de *T. cruzi* en el vector (Hartl y Clark, 1997; Venegas *et al.*, 2011).

La existencia de infecciones multiclonales en pacientes chagásicos podría depender de factores relacionados con la resistencia o susceptibilidad de los genotipos de *T. cruzi* frente a la respuesta inmune del hospedero o a propiedades intrínsecas de cada clon del parásito, tales como preferencia histotrópica (tropismo tisular), diferencias en infectividad, o ambas (Rozas *et al.*, 2007). La fase clínica de la enfermedad también puede ser un factor relevante en la mantención de la multiclonalidad ya que el curso de la infección en el hospedero humano podría conducir a reducirla, teniendo en cuenta que los patrones de interacción entre muchos clones pueden cambiar drásticamente, en especial durante el paso de una población multiclonal desde un vector invertebrado al ser humano. De este modo, es probable que algunos clones sean eliminados por su incapacidad para competir y propagarse en el ambiente humano o por la acción de mecanismos de defensa del hospedero, lo que disminuiría la complejidad clonal de la población de *T. cruzi* infectante (Oliveira *et al.*, 1997). Es así que, en pacientes chagásicos crónicos, los clones circulantes en sangre no necesariamente deben ser considerados como una muestra representativa de la infección inicial, pues un clon de *T. cruzi* puede ser seleccionado durante la interacción de largo plazo y las diferencias de tropismo tisular pueden interferir con la distribución de las subpoblaciones del parásito en el hospedero (Machado *et al.*, 2001; Burgos *et al.*, 2007).

Por otra parte, también existen interacciones entre *T. cruzi* y el insecto vector, las cuales influyen sobre las características biológicas, patológicas y genéticas de las poblaciones del parásito presentes en los triatominos, y podrían conducir a la selección o eliminación de clones de *T. cruzi* pertenecientes a linajes diferentes (Kollien y Schaub, 1997; Schmidt *et al.*, 1998).

## 2.4 Técnicas moleculares

Para definir los clones de parásitos presentes en las muestras de *T. cruzi* analizadas en este estudio, se eligió el método de análisis de marcadores microsatélites, también conocido como STR ("Short Tandem Repeats", repeticiones cortas en tandem) o SSR ("Simple Sequence Repeats", secuencias simples repetidas). Los microsatélites son secuencias de nucleótidos, cortas y repetidas, principalmente dinucleótidos de origen nuclear, generados por errores que comete la DNA polimerasa durante la replicación del genoma (Gasche *et al.*, 2003). Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA y muy dispersos en el genoma nuclear. Además, poseen una alta tasa de mutación, lo cual los hace muy polimórficos, y su facilidad de detección mediante ensayos de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite utilizarlos como marcadores moleculares en una gran variedad de aplicaciones en el campo de la genética, entre ellas filogenia y genética de poblaciones.

Estas secuencias se producen al azar y en un individuo o clon de parásito diploide, como es el caso de *T. cruzi*, se debería encontrar máximo dos secuencias distintas o alelos, lo que indicaría que ese individuo es heterocigoto para ese alelo (Oliveira *et al.*, 1998).

De este modo, el análisis de microsatélites constituye un método simple para determinar si una muestra del parásito corresponde a una población uniclonal (compuesta por un clon) o multiclonal, en cuyo caso se debería detectar más de dos alelos diferentes para alguno de los marcadores microsatélites utilizados (Oliveira *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 2001).

Por otra parte, el análisis de marcadores microsatélites permite la determinación de frecuencias alélicas. Los datos de frecuencia alélica se utilizan para obtener medidas de distancias genéticas, a partir de las cuales se logra la elaboración de árboles filogenéticos a través de programas computacionales diseñados para ese fin (Takezaki y Nei, 1996).

Teniendo en cuenta los antecedentes de literatura presentados aquí, en este estudio se propuso trabajar en base a la siguiente hipótesis:

## HIPÓTESIS

Las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en *T. infestans*, se diferencian genéticamente de las poblaciones del parásito presentes en pacientes chagásicos crónicos chilenos.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si las poblaciones de *T. cruzi* presentes en vectores domiciliarios se diferencian genéticamente de las encontradas en pacientes chagásicos crónicos.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las frecuencias alélicas de tres marcadores microsatélites en las poblaciones de *T. cruzi* presentes en *T. infestans* procedentes de las regiones de Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM), y compararlas con las frecuencias alélicas de poblaciones de *T. cruzi* detectadas en pacientes chagásicos crónicos.
2. Comparar las frecuencias alélicas de los clones predominantes de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en *T. infestans*, con aquellas encontradas en pacientes chagásicos crónicos, mediante el programa computacional "Genepop".
3. Determinar las distancias genéticas poblacionales,  $D_c$  y  $D_a^1$ , de las poblaciones de *T. cruzi* en estudio presentes en vectores y en pacientes, y de poblaciones de referencia de linajes conocidos, para construir los árboles filogenéticos correspondientes.
4. Comparar las frecuencias de linajes y clonalidad de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en triatominos y en pacientes chagásicos crónicos.

---

<sup>1</sup>  $D_c$  y  $D_a$  corresponden a medidas de distancia genética para la construcción de árboles filogenéticos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Poblaciones de *Trypanosoma cruzi* estudiadas

- a) Poblaciones de *T. cruzi* procedentes de 109 triatomíneos capturados en Chile por el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans* del Ministerio de Salud. Periodo 2005 - 2007. Las poblaciones de *T. cruzi* estudiadas provenían de triatomíneos infectados (positivos a la detección del DNA kinetoplastídico por PCR), clasificados según género y especie como *T. infestans* en el Instituto de Salud Pública (ISP), procedentes de las regiones de Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM) de Chile.
- b) Datos previos sobre clonalidad, frecuencia alélica y genotipos de los clones predominantes infectantes de *T. cruzi* detectados en 80 pacientes chagásicos crónicos<sup>2</sup> chilenos, en base a los marcadores microsatélites SCLE10, SCLE11 y MCLE01, obtenidos previamente en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Miranda, 2007; Venegas *et al.*, 2009).
- c) Datos previos sobre genotipos de clones de *T. cruzi* descritos en la literatura, correspondientes a los linajes TcI, TcII, TcIII, e híbridos (H) TcV y TcVI (De Freitas *et al.*, 2006).

#### 3.2 Muestras de DNA de *Trypanosoma cruzi*

Una vez realizada la clasificación taxonómica de los ejemplares de triatomíneos recolectados por el Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans*, el ISP entregó a este proyecto el sobrenadante obtenido a partir del contenido intestinal de cada triatomíneo, después de ser hervido y centrifugado. Este sobrenadante se empleó como fuente de DNA de *T. cruzi* para el ensayo de PCR para amplificación de microsatélites realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

---

<sup>2</sup> Datos obtenidos y publicados bajo el consentimiento de los pacientes de acuerdo a normas Fondecyt.

### 3.3 Análisis de marcadores microsatélites

En el laboratorio fueron utilizados tres pares de partidores (Anexo 1) fluorescentes para amplificar los marcadores microsatélites SCLE10, SCLE11, MCLE01, previamente descritos (Oliveira *et al.*, 1998). Los partidores estaban marcados con distintos fluoróforos para poder distinguir posteriormente los productos de amplificación de cada marcador microsatélite mediante electroforesis capilar. El procedimiento de PCR de marcadores microsatélites realizado fue una modificación de la técnica descrita por Oliveira *et al.*, (1998), que consistió en la reamplificación del DNA del parásito amplificado por PCR (Coñoeacán, 2006; Miranda, 2007; Venegas *et al.*, 2011) mediante un segundo ensayo de PCR utilizando los mismos partidores y una alícuota de 1 µl del producto de la primera amplificación, con el objetivo de disponer de una mayor cantidad de DNA que aquella obtenida inicialmente.

**Protocolo de Amplificación:** desnaturalización inicial (94°C por 4 minutos), 35 ciclos de amplificación (1 ciclo = 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 50°C y 2 minutos de extensión a 72°C) y extensión final (10 minutos a 72° C).

**Protocolo de Reamplificación:** a diferencia del primer protocolo, esta vez se realizaron 30 ciclos de amplificación y se utilizó una temperatura de hibridación de 52°C. Los ensayos de amplificación y reamplificación se realizaron en un termociclador Techne TC-412.

Posteriormente, para detectar los productos de amplificación de microsatélites de *T. cruzi*, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida<sup>3</sup> al 15% donde se cargaron 2.5 uL de producto de PCR en cada carril y 1 uL del marcador de peso molecular de 50 pares de bases (Promega Corp). La corrida electroforética se realizó durante 90 minutos a un voltaje constante de 150 V, bajo condiciones establecidas previamente (Miranda, 2007). Para revelar el gel se utilizó un “kit” comercial de tinción de ácidos nucleicos con bromuro de etidio, según el método recomendado por el fabricante

---

<sup>3</sup> La manipulación de elementos que constituyen un riesgo químico como el empleo de geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, así como el manejo de desechos de esta naturaleza, se llevó a cabo según se describe en el manual de normas de bioseguridad 2008 elaborado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.

(Winkler). En cuanto a los tamaños de banda que se esperaba detectar en los geles de poliacrilamida, para el marcador SCLE10 se esperaba obtener productos de amplificación de 200 a 300 pares de bases, mientras que para los marcadores MCLE01 y SCLE11 se esperaban productos de amplificación de 100 a 200 pares de bases (Anexo 2).

Para poder realizar el análisis de microsatélites, las muestras que resultaron positivas a la detección en geles de poliacrilamida fueron enviadas al servicio de electroforesis capilar “The Core DNA Sequencing Facility of the Roy J. Carver Biotechnology Center” de la Universidad de Illinois, Estados Unidos. A través de este método fue posible detectar los productos de amplificación fluorescentes y asignar con alta precisión el número de pares de bases (tamaño) de los distintos alelos por cada marcador. Para esto, en cada electroforesis se utilizó, simultáneamente, alelos clonados de tamaño conocido de cada marcador, como control.

Los perfiles (electroferogramas) obtenidos de cada muestra fueron enviados vía e-mail al laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, para ser analizados en este estudio. En este trabajo, el tamaño mínimo de detección y reconocimiento de un “peak”, equivalente a un alelo en el electroferograma, fue establecido arbitrariamente en 80 unidades de fluorescencia (UF), según lo recomendado por Venegas *et al.*, (2011).

Para comparar la distribución de alelos entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatomíneos y las poblaciones provenientes de pacientes chagásicos crónicos, se determinó las frecuencias alélicas en las muestras mediante el programa computacional MSA (“Microsatellite analyzer”) versión 4.05. En este análisis se consideraron todos los alelos de *T. cruzi* detectados en cada muestra proveniente de triatomíneos de las regiones III, V y RM, y también todos los alelos detectados anteriormente en muestras provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos (Miranda, 2007).

Luego, para indagar si las poblaciones de *T. cruzi* estudiadas se diferenciaban genéticamente, se determinó los genotipos de los clones predominantes (CP) en cada muestra y se comparó las frecuencias alélicas mediante el programa computacional “Genepop”.

La determinación del genotipo de los CP de *T. cruzi* en muestras que contenían múltiples alelos por locus, se realizó comparando el tamaño en UF de los dos “peaks” más altos en el electroferograma y su condición de homocigosis o heterocigosis. Entonces, si la tasa de intensidad o cociente resultante entre el menor y el mayor de estos “peaks” era menor o igual a 0,33, se concluía que el genotipo del CP en esa muestra estaba conformado por alelos del mismo tamaño, por lo tanto en estado homocigoto (el tamaño de alelo correspondía al tamaño del “peak” de mayor intensidad). En cambio, si la tasa de intensidad entre el tamaño de ambos “peaks” era mayor a 0,33, se pensaba que el genotipo del CP para esos alelos tenía condición heterocigota. Sin embargo, para que un clon fuera considerado heterocigoto se requería además, que la diferencia en el número de pares de bases que separaba ambos “peaks” no excediera los 32, 16 ó 20 pares de bases, para los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01, respectivamente.

Por último, para determinar la distribución de clonalidad en las poblaciones de *T. cruzi* presentes en triatomínicos y pacientes chagásicos crónicos, y compararlas en base a esto, se determinó el número mínimo de clones (NMC) de *T. cruzi* provenientes de triatomínicos y se utilizó la información publicada anteriormente acerca del NMC de *T. cruzi* en pacientes chagásicos crónicos (Miranda, 2007). El NMC de *T. cruzi* en cada muestra de triatomínicos se estimó en base al marcador microsatélite que tuviera el mayor número de alelos y a la asignación del genotipo del CP junto al total de alelos adicionales encontrados en cada muestra, dividido por dos. Si el genotipo del CP era homocigoto, se consideraba como 1 alelo, en cambio si era heterocigoto, equivalía a 2 alelos. Al sumar el número de alelos del CP más la mitad del número de alelos adicionales, se obtuvo el NMC. En aquellos casos en que de esta operación se obtuviese un número decimal de alelos que exhibía la fracción 0,5, entonces se añadía un clon adicional en el NMC.

En base al NMC de cada muestra, si en alguno de los tres loci analizados se detectaba la presencia de más de dos alelos, entonces se consideraba que la muestra en estudio era multiclonal, es decir, estaba conformada por más de un clon de *T. cruzi*. Por el contrario, si la muestra estaba conformada por un solo clon, entonces se consideraba uniclonal.

### 3.4 Determinación de linajes de clones predominantes de *T. cruzi*

Para la determinación de linajes basada en el genotipo del clon predominante y en datos de clones de *T. cruzi* publicados anteriormente (De Freitas *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009), se utilizó el programa computacional “GeneClass” con el método Bayesiano descrito por Rannala y Mountain, (1997) y Piry *et al.*, (2004). Este programa asignó linajes a todos los clones predominantes, sin embargo en este estudio se consideró, exclusivamente, a aquellos clones cuyos linajes fueron asignados con una probabilidad mayor o igual al 70%.

### 3.5 Análisis estadístico

Para determinar si existía diferenciación genética entre las poblaciones de *T. cruzi* estudiadas, se realizó un análisis estadístico mediante el programa computacional “Genepop”<sup>4</sup>, el cual permitió la comparación de las frecuencias alélicas de los clones predominantes de cada población, mediante el Algoritmo de Markov y la Prueba exacta de Fisher (Raymond y Rousset, 1995a, 1995b). Este método establece que existen diferencias genéticas significativas entre pares de poblaciones cuando se obtiene un valor de p menor a 0.05.

Además, una vez obtenidas las frecuencias de linajes, se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) mediante el programa computacional “EzAnalyze” versión 2.5<sup>5</sup>, con el fin de determinar si las diferencias encontradas entre las poblaciones de *T. cruzi* presentes en triatomos y las de pacientes chagásicos crónicos, se sustentaban estadísticamente.

---

<sup>4</sup> Genepop corresponde a un paquete de softwares de libre acceso, utilizado en estudios de genética de poblaciones.

<sup>5</sup> Complemento de Excel que permite realizar análisis estadísticos y es de obtención gratuita.

### 3.6 Análisis filogenético

Con el fin de establecer el grado de divergencia genética, o relación de parentesco, entre las poblaciones de *T. cruzi* procedentes de vectores triatominos *T. infestans* y aquellas procedentes de pacientes chagásicos crónicos, se realizaron reconstrucciones filogenéticas expresadas mediante la construcción de árboles filogenéticos en base al método “Neighbor-Joining”, presente en el paquete de programas computacionales “Phylip”<sup>6</sup> (Felsenstein, 1989).

Para investigar la relación de las muestras locales de *T. cruzi* con los linajes TcI, TcII, TcIII y los híbridos (H) TcV y TcVI (De Freitas *et al.*, 2006), en este estudio se incluyeron datos de clones de *T. cruzi* de linaje conocido. Para ello se determinaron las distancias genéticas Dc y Da, de alta eficiencia, con marcadores microsatélites previamente descritos (Takezaki y Nei, 1996), lo cual se realizó utilizando el programa computacional Microsatellite Analyzer (MSA) versión 4.0.5. Además, con el fin de conocer la fortaleza estadística de cada nodo, se realizaron 1.000 réplicas “bootstrap” mediante el programa computacional “Seqboot”.

---

<sup>6</sup> Phylip es un paquete de programas para realizar inferencias filogenéticas. Incluye los programas Seqboot y Neighbor-Joining.

#### 4. RESULTADOS

Se analizó el contenido intestinal de 109 triatominos provenientes de tres regiones de Chile, Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM), utilizando los marcadores microsatélites SCLE10, SCLE11 y MCLE01 previamente descritos (Oliveira *et al.*, 1998). Los resultados de este estudio se analizaron en conjunto con los datos de pacientes chagásicos crónicos obtenidos anteriormente en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Miranda, 2007; Venegas *et al.*, 2010), a partir de los mismos tres marcadores microsatélites.

Con respecto al análisis de genética de poblaciones de los clones de *T. cruzi* detectados en triatominos y en pacientes chagásicos crónicos, se obtuvo la frecuencia alélica de los clones predominantes encontrados en cada población en estudio, según lo descrito en materiales y métodos, mediante el programa computacional MSA. Las Figuras 3, 4 y 5 ilustran la frecuencia alélica de las poblaciones de *T. cruzi* en estudio, obtenida con los marcadores microsatélites SCLE10, SCLE11 y MCLE01, respectivamente. Con todos los marcadores microsatélites se obtuvo un perfil de distribución de alelos diferente al comparar las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatominos con aquellas provenientes de pacientes chagásicos crónicos. Esto se evidencia claramente al observar la distribución de alelos con los marcadores SCLE10 (Figura 3) y SCLE11 (Figura 4). En la Figura 3, se observa la ausencia de alelos provenientes de triatominos entre los valores 103 y 133, en donde sólo se encontraron alelos provenientes de pacientes y por el contrario, en la Figura 4, entre los valores 161 y 201 sólo se encontraron alelos provenientes de triatominos.

Figura 3. Gráfico de distribución de frecuencia alélica de *T. cruzi* en poblaciones presentes en triatomos y en pacientes chagásicos crónicos, detectada con el marcador microsatélite SCLE10.

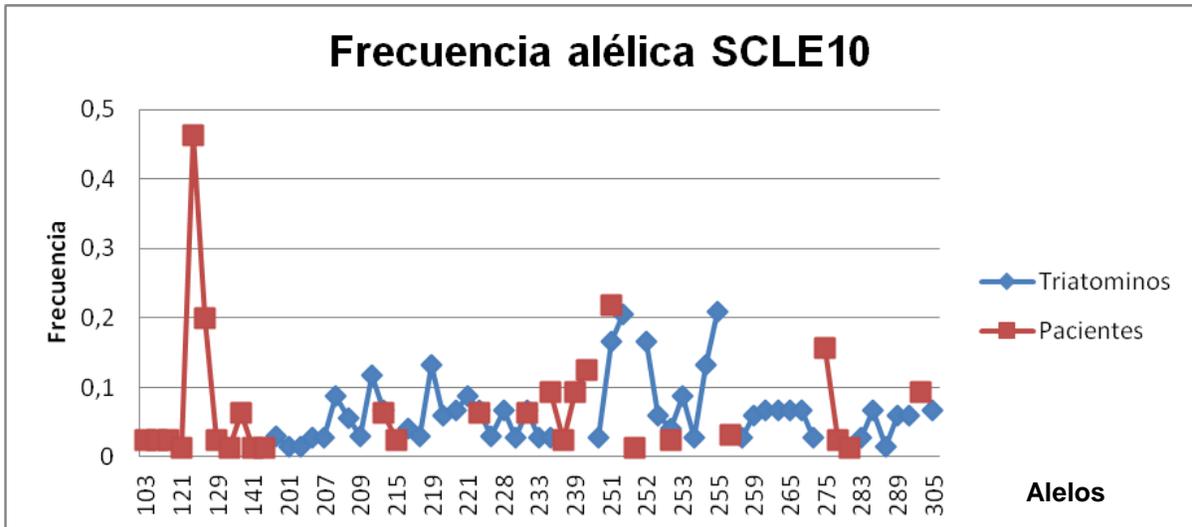
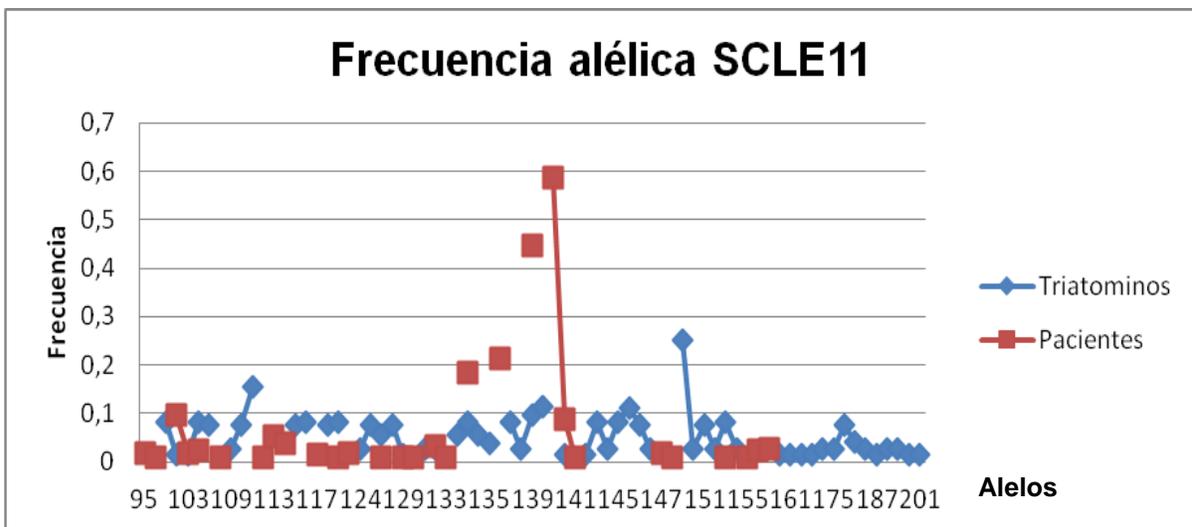
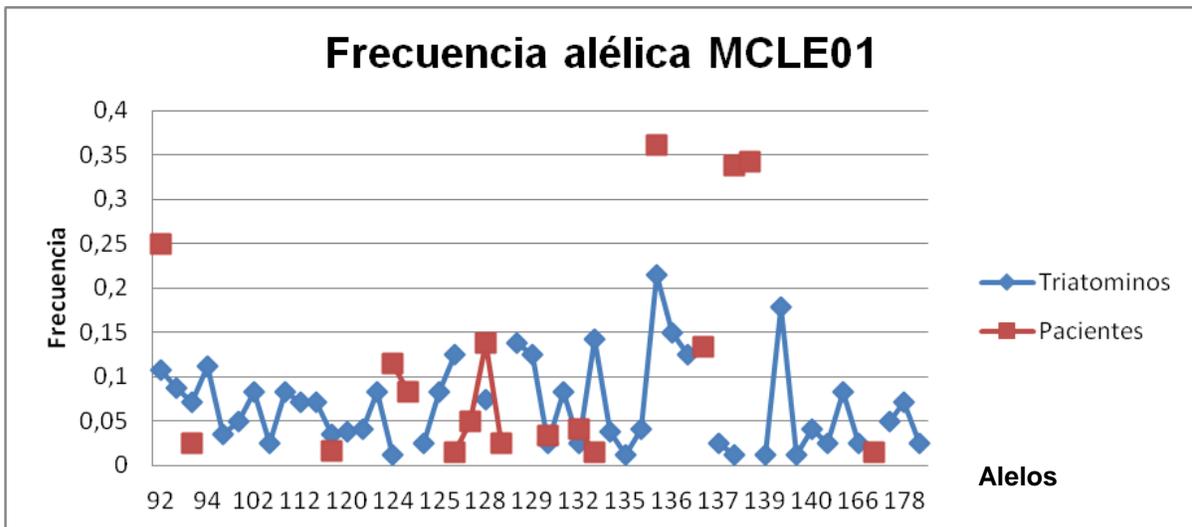


Figura 4. Gráfico de distribución de frecuencia alélica de *T. cruzi* en poblaciones presentes en triatomos y en pacientes chagásicos crónicos, detectada con el marcador microsatélite SCLE11.



**Figura 5. Gráfico de distribución de frecuencia alélica de *T. cruzi* en poblaciones presentes en triatominos y en pacientes chagásicos crónicos, detectada con el marcador microsatélite MCLE01.**



En cuanto a la comparación de las poblaciones en estudio en base a frecuencia alélica, la Tabla 1 muestra el valor de p correspondiente a la significancia estadística de las diferencias genéticas poblacionales encontradas, con los marcadores SCLE10, SCLE11 y MCLE01 respectivamente, obtenido al comparar pares de poblaciones mediante el Algoritmo de Markov. Con cada uno de los marcadores se detectó una diferencia genética estadísticamente significativa entre las poblaciones en estudio (valor de  $p < 0.05$ ). La Tabla 2 muestra la significancia estadística de las diferencias genéticas encontradas para el conjunto de loci analizados, al comparar pares de poblaciones mediante el Método de Fischer y se observa que la diferencia genética entre las poblaciones en estudio se sustenta estadísticamente.

**Tabla 1. Comparación entre pares de poblaciones de *T. cruzi* en base a las frecuencias alélicas de clones predominantes, según locus analizado y su significancia estadística.**

Locus SCLE10		Locus SCLE11		Locus MCLE01	
Pares de poblaciones	Valor de p	Pares de poblaciones	Valor de p	Pares de poblaciones	Valor de p
<b>V &amp; III</b>	0.00000	<b>V &amp; III</b>	0.00045	<b>V &amp; III</b>	0.00005
<b>RM &amp; III</b>	0.00000	<b>RM &amp; III</b>	0.00908	<b>RM &amp; III</b>	0.00000
<b>RM &amp; V</b>	0.00002	<b>RM &amp; V</b>	0.01158	<b>RM &amp; V</b>	0.00003
<b>San &amp; III</b>	0.00000	<b>San &amp; III</b>	0.00000	<b>San &amp; III</b>	0.00000
<b>San &amp; V</b>	0.00000	<b>San &amp; V</b>	0.00000	<b>San &amp; V</b>	0.00000
<b>San &amp; RM</b>	0.00000	<b>San &amp; RM</b>	0.00000	<b>San &amp; RM</b>	0.00000
<b>Xen &amp; III</b>	0.00000	<b>Xen &amp; III</b>	0.00000	<b>Xen &amp; III</b>	0.00000
<b>Xen &amp; V</b>	0.00000	<b>Xen &amp; V</b>	0.00000	<b>Xen &amp; V</b>	0.00000
<b>Xen &amp; RM</b>	0.00000	<b>Xen &amp; RM</b>	0.00000	<b>Xen &amp; RM</b>	0.00000
<b>Xen &amp; San</b>	0.00000	<b>Xen &amp; San</b>	0.00000	<b>Xen &amp; San</b>	0.00000

El análisis fue realizado mediante el programa Genepop versión 4.0.7 y los parámetros de la cadena de Markov. Para este análisis se consideraron los clones predominantes (CP) de *T. cruzi* de las muestras de triatomíneos provenientes de las regiones de Valparaíso (**V**), Atacama (**III**) y Metropolitana (**RM**) y los CP de *T. cruzi* obtenidos de sangre (**San**) y xenodiagnóstico (**Xen**) de pacientes chagásicos crónicos. Un valor de  $p < 0.05$  indica diferencias genéticas significativas entre las poblaciones comparadas.

**Tabla 2: Diferenciación genética entre pares de poblaciones de *T. cruzi* en base a las frecuencias alélicas de los clones predominantes y su significancia estadística**

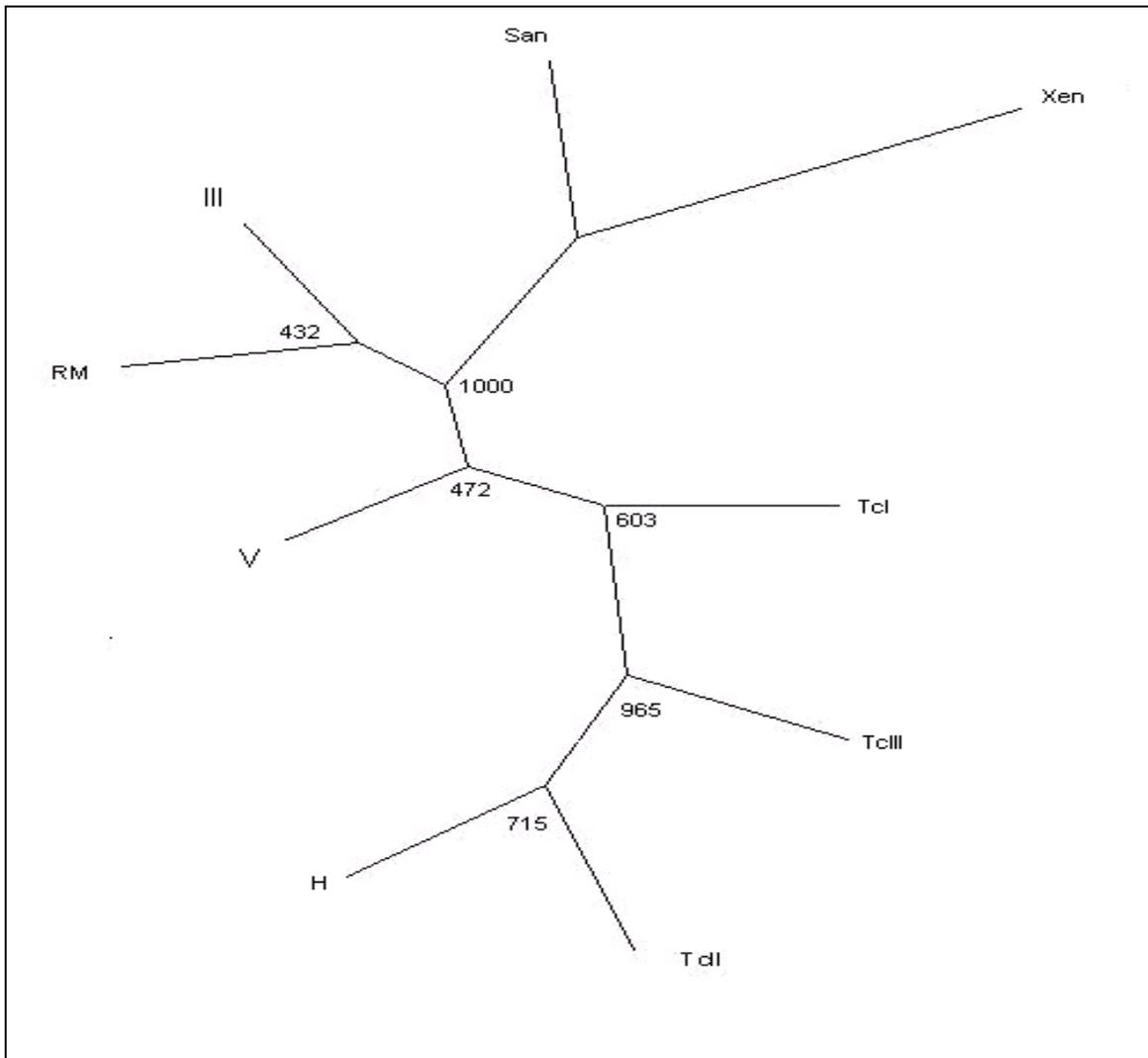
Pares de poblaciones	Valor de p
<b>III &amp; V</b>	Altamente significativo*
<b>III &amp; RM</b>	Altamente significativo*
<b>V &amp; RM</b>	0.000000
<b>III &amp; San</b>	Altamente significativo*
<b>V &amp; San</b>	Altamente significativo*
<b>RM &amp; San</b>	Altamente significativo*
<b>III &amp; Xen</b>	Altamente significativo*
<b>V &amp; Xen</b>	Altamente significativo*
<b>RM &amp; Xen</b>	Altamente significativo*
<b>San &amp; Xen</b>	Altamente significativo*

\* Al menos una de las pruebas individuales combinadas arroja un valor estimado de p igual a cero. El análisis fue realizado mediante el programa Genepop versión 4.0.7 y el Método de Fisher. Para este análisis se consideraron los clones predominantes (CP) de *T. cruzi* de las muestras de triatomíneos provenientes de las regiones de Valparaíso (**V**), Atacama (**III**) y Metropolitana (**RM**) y los CP de *T. cruzi* obtenidos de sangre (**San**) y xenodiagnóstico (**Xen**) de pacientes chagásicos crónicos.

Una vez determinadas las distancias genéticas poblacionales  $D_c$  y  $D_a$  (Anexo 3), de las poblaciones de *T. cruzi* en estudio y de poblaciones de referencia de linajes conocidos, se construyó los árboles filogenéticos correspondientes. La Figura 4 muestra el árbol de consenso construido a partir de clones de literatura de *T. cruzi* de linaje conocido (De Freitas *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009), clones predominantes de *T. cruzi* provenientes de sangre y xenodiagnóstico de triatomíneos obtenidos de las regiones III, V y RM para el presente estudio. El árbol de consenso construido utilizando la distancia genética poblacional  $D_c$  quedó constituido por tres ramas principales (cada una respaldada por un “bootstrap” del 100%), originando un primer nodo para clones de *T. cruzi* provenientes de pacientes, un segundo nodo para los clones de *T. cruzi* provenientes de triatomíneos de las regiones III, V y RM y un tercer nodo constituido por los clones de literatura.

La comparación entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatominos, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos en base a las frecuencias de linajes de *T. cruzi* de cada una de ellas, se realizó a partir del linaje previamente asignado a los clones predominantes (CP) dentro de cada población en estudio, mediante el programa computacional "GeneClass".

**Figura 4. Árbol filogenético de clones predominantes de *T. cruzi* pertenecientes a las distintas poblaciones en estudio y clones de literatura de linaje conocido**



Árbol de consenso construido en base a la distancia genética poblacional  $D_c$  y 1.000 réplicas "bootstrap" mediante el programa "Seqboot" y el método "Neighbor-Joining". Se observan tres nodos conformados por clones predominantes (CP) de *T. cruzi* provenientes de triatominos de las regiones de Valparaíso (V), Atacama (III) y Metropolitana (RM), CP de *T. cruzi* obtenidos de sangre (San) y xenodiagnóstico (Xen) de pacientes chagásicos crónicos y clones de literatura de linaje conocido (TcI, TcII, TcIII y H).

En la Tabla 3 se observa la distribución de linajes de los CP de *T. cruzi* de las poblaciones en estudio, en las cuales fue posible detectar CP pertenecientes a los linajes TcI, TcIII y H.

El linaje TcI resultó ser el más frecuentemente detectado en los CP de todas las poblaciones en estudio (74,4% del total de clones en estudio), seguido de los linajes TcIII (17,6%) y H (8%). Los CP provenientes de sangre y de xenodiagnóstico de pacientes se agruparon principalmente en el linaje TcI (82% y 84,3%, respectivamente) al igual que los CP provenientes de triatomino de las regiones III, V y RM, sin embargo en los triatomino el porcentaje del linaje TcI fue inferior (59,4%). En CP provenientes de triatomino, los linajes TcIII y H se detectaron en igual frecuencia (20,3%), mientras que en sangre y xenodiagnóstico de pacientes el linaje TcIII se detectó con una frecuencia de 16,4% y 15,7%, respectivamente. El linaje H se detectó en el 1,6% de las muestras de sangre, encontrándose ausente en xenodiagnóstico de pacientes. Las diferencias detectadas en las frecuencias de linajes entre las muestras de triatomino y muestras tanto de sangre como de xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos son estadísticamente significativas (Tabla 4).

**Tabla 3. Frecuencia y distribución de linajes de *T. cruzi* en clones predominantes detectados en triatomino de tres regiones endémicas, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos chilenos.**

Linaje	Población de origen de los clones predominantes			
	Triatomino	San	Xen	Total
<b>TcI</b>	38 (59,4)	50 (82)	43 (84,3)	131 (74,4)
<b>TcIII</b>	13 (20,3)	10 (16,4)	8 (15,7)	31 (17,6)
<b>H</b>	13 (20,3)	1 (1,6)	0	14 (8)
<b>Total</b>	64 (100)	61 (100)	51 (100)	176 (100)

Entre paréntesis aparece el porcentaje (%) del total al que corresponde cada frecuencia. **Triatomino**: clones predominantes (CP) provenientes de triatomino de las regiones III, V y RM. **San**: CP provenientes de sangre. **Xen**: CP provenientes de xenodiagnóstico de pacientes.

**Tabla 4. Comparación de linajes de clones predominantes de *T. cruzi*, detectados en muestras de triatomino de tres regiones endémicas de Chile, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos, y su significancia estadística.**

Poblaciones de origen de los CP	Número de CP de cada linaje		
	Tcl	TcIII	H
<b>Triatomino</b>	38	13	13
<b>San</b>	50	10	1
<b>Xen</b>	43	8	0
<b>Total</b>	131	31	14
Pares de poblaciones	Valor de p		
<b>Triatomino – San</b>	0,002*		
<b>Triatomino – Xen</b>	0,001*		
<b>San – Xen</b>	1,000 .		

\*valores significativos ( $p < 0,05$ ). **Triatomino**: clones predominantes (CP) provenientes de triatomino de las regiones III, V y RM. **San**: CP provenientes de sangre. **Xen**: CP provenientes de xenodiagnóstico de pacientes chagásicos.

El estudio de la distribución de la clonalidad de *T. cruzi* en las poblaciones del parásito detectadas en vectores triatomino, sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos, considerando la totalidad de los clones detectados en cada población, se realizó con el objetivo de indagar si en cuanto a la cantidad de clones de *T. cruzi* (monoclonalidad o multiclonalidad) presentes en las poblaciones en estudio, se manifiestan diferencias entre ellas como las encontradas al comparar frecuencia alélica y distribución de linajes de los clones predominantes de estas poblaciones del parásito.

En la Tabla 5 se observa que las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatomino de las regiones III, V y RM presentaron una distribución multiclonal (67%) y uniclonal (33%),

a diferencia de aquellas poblaciones provenientes tanto de sangre como de xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos, cuya distribución fue multiclonal (44,4% y 36,1% respectivamente) y uniclonal (55,6% y 63,9%, respectivamente). La mayoría de las muestras tanto de sangre y xenodiagnóstico de pacientes como de las muestras obtenidas de triatomíneos arrojaron la presencia de a lo más 2 clones (77,8%; 91,7% y 56,8%, respectivamente). En las poblaciones en estudio, las muestras multiclonales estaban compuestas en su mayoría de dos clones de *T. cruzi*, y conforme al aumento en el número de clones, la cantidad de muestras fue disminuyendo drásticamente, situación que se acentuó en el caso de las poblaciones provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes, en las cuales no se detectaron muestras compuestas por más de 4 clones de *T. cruzi*.

**Tabla 5. Frecuencia del número de clones de *T. cruzi* detectados en los distintos tipos de muestras (triatomíneos, sangre y xenodiagnóstico).**

Nº de clones	Tipo de muestra			
	Triatomíneos	San	Xen	Total
<b>1</b>	36 (33,0)	40 (55,6)	46 (63,9)	122 (48,2)
<b>2</b>	26 (23,8)	16 (22,2)	20 (27,8)	62 (24,5)
<b>3</b>	15 (13,8)	15 (20,8)	6 (8,3)	36 (14,2)
<b>4</b>	8 (7,3)	1 (1,4)	0	9 (3,6)
<b>5</b>	12 (11,0)	0	0	12 (4,7)
<b>6</b>	5 (4,6)	0	0	5 (2,0)
<b>7</b>	3 (2,8)	0	0	3 (1,2)
<b>8</b>	3 (2,8)	0	0	3 (1,2)
<b>9</b>	1 (0,9)	0	0	1 (0,4)
<b>Total</b>	109 (100)	72 (100)	72 (100)	253 (100)

Entre paréntesis aparece el porcentaje (%) del total al que corresponde cada frecuencia. **Triatomíneos:** muestras provenientes de triatomíneos de las regiones III, V y RM. **San:** muestras provenientes de sangre. **Xen:** muestras provenientes de xenodiagnóstico de pacientes.

## 5. DISCUSIÓN

Los gráficos de distribución de frecuencia alélica constituyen una primera aproximación, principalmente de tipo cualitativo, al abordaje de la comparación de las poblaciones en estudio en base a los alelos que las componen. Los perfiles de frecuencia alélica construidos a partir de las poblaciones de *T. cruzi* que infectan a triatominos y a pacientes chagásicos crónicos resultaron diferentes, lo cual se evidencia claramente al observar la distribución de la frecuencia alélica obtenida con SCLE10 y SCLE11. Con el marcador SCLE10 (Figura 1), entre los valores 103 y 133, sólo se encontraron alelos provenientes de pacientes, mientras que entre los valores 161 y 121, sólo se encontraron alelos provenientes de triatominos al revisar el perfil de distribución de frecuencia alélica obtenido con el marcador SCLE11 (Figura 2). Considerando que la mayoría de las muestras de triatominos fueron obtenidas de la región de Valparaíso (V), una posible explicación para las diferencias encontradas entre los perfiles de frecuencia alélica de pacientes y triatominos es que los pacientes en estudio hubiesen adquirido la infección de parásitos provenientes de otras regiones del país.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la comparación de poblaciones en base a su frecuencia alélica, las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de sangre, xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos y de triatominos de las regiones de Atacama (III), Valparaíso (V) y Metropolitana (RM) de Chile, se encuentran genéticamente diferenciadas (Tablas 1 y 2).

Probablemente la principal razón que explicaría esta diferencia genética sería que las poblaciones de *T. cruzi* se encuentran sometidas regularmente a control poblacional por efecto del Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans* del Ministerio de Salud, el cual ha sido implementado en Chile a partir del año 1991 y cuyo desarrollo ha permitido certificar, en este país, la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas dentro del ciclo doméstico desde el año 1999 (WHO, 2000). Esta medida habría restringido tanto la abundancia como el tiempo de sobrevivencia de los insectos vectores, lo cual determinaría la disminución del número potencial de vectores que se alimentan de vertebrados y que cada vector se alimente de un menor número de vertebrados durante su vida. Esto conduciría, en el ciclo doméstico de

transmisión de la enfermedad de Chagas, a una disminución del flujo génico entre poblaciones de *T. cruzi* presentes en humanos e insectos vectores y por lo tanto promovería la diferenciación genética de las poblaciones de *T. cruzi* existentes en triatomíneos y en pacientes chagásicos. Otra causa complementaria o alternativa sería que la reproducción principalmente clonal de *T. cruzi* limita el intercambio genético entre las poblaciones (Oliveira *et al.*, 1998; Brisse *et al.*, 2000). Además, tratándose de pacientes chagásicos crónicos, los clones circulantes probablemente no representan a los clones de *T. cruzi* con los que estos pacientes se infectaron inicialmente (Coronado *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2010). Sin embargo, otra posible explicación para los resultados obtenidos sería que los pacientes hubiesen adquirido la infección en regiones diferentes a las estudiadas en este trabajo.

El árbol filogenético obtenido utilizando la distancia genética poblacional  $D_c$  quedó constituido por tres ramas o nodos principales. Los clones provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos aparecen agrupados en el mismo nodo y conformaron el primer grupo, lo que sugiere que tienen un ancestro en común. Este resultado se obtuvo con un alto respaldo estadístico (100% de "bootstrap"). Considerando que las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de sangre y xenodiagnóstico se obtuvieron del mismo grupo de pacientes chagásicos, tanto de sangre periférica como de xenodiagnóstico y además fueron sometidas al sistema inmune humano, agente seleccionador de ciertos clones específicos (Oliveira *et al.*, 1998) que promueve la sobrevivencia de los clones más adaptados, se explicaría que estas poblaciones aparezcan juntas en el primer nodo y separadas del segundo y tercero. El segundo nodo principal quedó constituido por los clones provenientes de triatomíneos de las regiones III, V y RM de Chile y el tercer nodo principal, por los clones descritos en la literatura (De Freitas *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009). En el caso del segundo nodo, el hecho de que todas las muestras provenían de triatomíneos recolectados en Chile, aunque la III región se encuentre separada por aproximadamente 600 Km de la V y RM, explicaría este resultado. Asimismo, el tercer nodo, del cual emergen varias ramas correspondientes a los linajes TcI, TcII, TcIII e híbridos (H), se podría deber a que todas las muestras de *T. cruzi* que lo conforman se habían cultivado previamente en laboratorio, además de que la casi totalidad de ellas provenían de diferentes regiones de Brasil (De Freitas *et al.*, 2006; Venegas *et al.*, 2009). En este nodo de muestras extranjeras, el linaje TcI se encuentra

más cercano a TcIII que a TcII, como es de esperar de acuerdo a la literatura (Brisse *et al.*, 2000; Westenberger *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2006). El árbol de consenso obtenido en este estudio a partir de la distancia genética poblacional  $D_a$ , no arrojó resultados sustentables estadísticamente (resultados no mostrados), por lo cual probablemente esta distancia no se ajusta a la tasa mutacional de los microsatélites estudiados.

Para determinar la distribución de clones de *T. cruzi* en ambos tipos de hospederos, vertebrado e invertebrado, dentro del ciclo doméstico de transmisión de la enfermedad de Chagas, fue importante realizar la comparación de las frecuencias de linajes y clonalidad entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatominos de las tres regiones en estudio (III, V y RM) y las poblaciones provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos.

Se analizó en primer lugar la frecuencia de linajes, donde el más frecuente en el total de la población en estudio resultó ser el linaje TcI (74,4%), seguido del TcIII (17,6%) y tercer lugar el H (8%). Al comparar la distribución de linajes de *T. cruzi* presentes en triatominos, sangre y xenodiagnóstico, se destacó que en triatominos el linaje H alcanzó un 20%, encontrándose en bajísima frecuencia en sangre (1,6%) y ausente en xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos ( $p < 0,05$ ). Lo anterior sugiere que este linaje se encuentra más adaptado a insectos triatominos, lo que concuerda con los hallazgos de estudios previos realizados en base a kDNA (Coronado *et al.*, 2006). El presente estudio detectó el linaje TcI en más de la mitad de las muestras de triatominos (59,3%) y en una muy alta frecuencia en sangre (82%) y xenodiagnóstico (84,3%) de pacientes, resultados también similares a los obtenidos por Coronado *et al.*, (2006). Esto sugiere que los clones pertenecientes a este linaje serían más resistentes a la selección ejercida por el sistema inmune y se encontrarían más adaptados a hospederos vertebrados (Venegas *et al.*, 2011). En esta memoria no se detectaron clones de *T. cruzi* pertenecientes al linaje TcII, resultado que se podría atribuir a que el análisis de frecuencias de linajes fue realizado en base a los clones predominantes de cada una de las poblaciones en estudio debido a la dificultad para determinar el genotipo de los clones minoritarios detectados en las muestras de cada población (Venegas *et al.*, 2011) o a que en las muestras analizadas efectivamente no se encontraran presentes clones pertenecientes a este linaje.

Al comparar la clonalidad entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatominos y de sangre y xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos, los resultados sugieren claras diferencias. Las poblaciones de *T. cruzi* que infectan a triatominos son principalmente multiclonales (67%), a diferencia de lo detectado en sangre y xenodiagnóstico de pacientes, cuyas poblaciones infectantes son en su mayoría uniclonales (55,6% y 63,9% respectivamente). Por otra parte, las muestras multiclonales de las poblaciones en estudio están compuestas en su mayoría de dos clones de *T. cruzi*, y conforme al aumento en el número de clones la cantidad de muestras disminuye. Esta tendencia se observa más marcadamente en las poblaciones provenientes de sangre y xenodiagnóstico de pacientes, entre las cuales la máxima multiclonalidad está representada por muestras compuestas por 4 clones, mientras que en triatominos incluso se detectó una muestra compuesta por 9 clones de *T. cruzi*. Estos resultados concuerdan con reportes de literatura, en los que se ha señalado que es de esperar que exista una menor gama de clones circulantes en pacientes chagásicos crónicos que en los triatominos (Oliveira *et al.*, 1998). Este fenómeno ocurriría debido a que los clones de *T. cruzi* se encontrarían expuestos a presiones de selección en los pacientes chagásicos ejercidas por la respuesta inmune del paciente, además de la predilección de ciertos clones por algunos tejidos. En cambio, en el intestino de los triatominos, se encontrarían condiciones para la diferenciación y proliferación de estos parásitos, lo cual favorecería el desarrollo de una mayor gama de clones de *T. cruzi* en estas condiciones que en animales vertebrados (Oliveira *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2001; Coronado *et al.*, 2006).

En este trabajo, se pudo evidenciar además el predominio de muestras de *T. cruzi* compuestas a lo más por dos clones, tanto en sangre (77,8%) y xenodiagnóstico (91,7%) de pacientes como en triatominos de las regiones en estudio (56,8%), lo que concuerda con estudios anteriores (Oliveira *et al.*, 1998; Venegas *et al.*, 2011). Es probable también que los triatominos se alimenten de un número reducido de mamíferos dentro del ciclo doméstico de transmisión de la enfermedad de Chagas, escenario que limitaría la gama de clones de *T. cruzi* infectantes. Adicionalmente, esto podría reflejar el probable efecto del control poblacional logrado como resultado de la implementación del Programa de Erradicación de la Infestación Domiciliaria de *T. infestans* del Ministerio de Salud, el cual aparece como principal responsable de la disminución de la diversidad clonal de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en triatominos al promover la interrupción del ciclo de

transmisión de clones de *T. cruzi* entre los insectos vectores domiciliarios y vertebrados. De este modo, las poblaciones detectadas en triatominos probablemente corresponderían a aquellas sobrevivientes al efecto del control ejercido sobre el ciclo doméstico de transmisión de la enfermedad de Chagas.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró la detección directa de clones de *T. cruzi* en muestras provenientes tanto de pacientes chagásicos crónicos como de vectores *T. infestans* domiciliarios y peridomiciliarios, analizando tres loci nucleares mediante marcadores microsatélites (SCLE10, SCLE11 y MCLE01).
- Se determinó el genotipo y linaje de los clones de *T. cruzi* predominantes en muestras provenientes de pacientes chagásicos crónicos y de vectores *T. infestans*.
- Se confirmó la hipótesis propuesta: Las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en los vectores triatominos *T. infestans* domiciliarios y peridomiciliarios se diferencian genéticamente de las poblaciones del parásito que infectan a pacientes chagásicos crónicos.
- Las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de triatominos y pacientes chagásicos crónicos exhiben claras diferencias en cuanto a distribución de linajes y multiclonalidad.
- El linaje Tc1 se encuentra más frecuentemente en los pacientes chagásicos crónicos, mientras que el linaje H se encuentra casi exclusivamente en triatominos.
- Las poblaciones provenientes de triatominos exhiben mayor multiclonalidad que aquellas provenientes de pacientes, en concordancia con datos de la literatura.
- En pacientes chagásicos crónicos existe un predominio de muestras uniclonales.
- En muestras multiclonales -tanto en triatominos como en pacientes chagásicos crónicos- predominan aquellas conformadas por dos clones.
- El análisis filogenético originó un árbol de consenso compuesto por tres ramas principales. La primera agrupa a los clones de *T. cruzi* provenientes de pacientes; la segunda a los clones provenientes de triatominos de las regiones de Atacama, Valparaíso y Metropolitana; y la tercera rama agrupa a los clones descritos en la literatura.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**ACHA, P.N.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales: Parasitosis. 3ª ed. PAHO. Washington DC. 413 p.

**ANÓN.** 2004. Protozoan Diseases of the Cardiovascular and Lymphatic Systems [en línea]. **In:** Microbial Diseases Of The Cardiovascular And Limphatic Systems. <[http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap23/23-22\\_Trypanosoma.jpg](http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap23/23-22_Trypanosoma.jpg)> [consulta 02-10-2011].

**APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol al Día*. 14: 23-40.

**APT, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. **In:** *Parasitología Clínica*. 3ª ed. Edit. Mediterráneo. Santiago, Chile. pp 255-268.

**BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M.** 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*. 120: 513-526.

**BOTTO-MAHAN, C.; SEPÚLVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUÑA-RETAMAR, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardo* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Trop*. 105: 166-169.

**BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*. 30: 34-44.

**BURGOS, J.M.; ALTCHER, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, H.M.S.; SEIDENSTEIN, M.E.; PICCINALI, R.; FREITAS, J.M.; LEVIN, M.J.; MACCHI, L.; MACEDO, A.M.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A.G.** 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol*. 37: 1319-1327.

**CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUÑA, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007. Short report: *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. *Am J Trop Med Hyg*. 76(2): 324-326.

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

**COÑOEPÁN, W.** 2006. Estudio de aislados y clones de *Trypanosoma cruzi* precedentes de pacientes chagásicos, mediante el análisis de microsatélites. Memoria Título Bioquímico. Santiago, Chile. U. Santiago Chile, Fac. Química y Biología. 16-22 p.

**DE FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; VANESSA, F.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNÁNDEZ, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D.J.** 2006. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS pathogens. 2: 0226-0235.

**FELSENSTEIN, J.** 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Versión 3.2). Cladistics. 5: 164-166.

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

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

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

**KAPLINSKI, E.** 2011. Miocardiopatía chagásica: una cardiopatía importada. [en línea]. In: Sanitaria 2000. Publicación médica de cardiología. <[http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna\\_kaplinsky](http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna_kaplinsky)> [Consulta 22-08-2011].

**KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A.** 1997. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. Parasitol Res. 83: 781–788.

**MACEDO, A.M.; PIMENTA, J.; AGUIAR R.S.; MELO A.I.R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.J.; OLIVEIRA R.P.** 2001. Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 407-413.

**MACEDO, A.M.; OLIVEIRA R.P.; PENA S.D.J.** 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Rev Mol Med. 4(5): 1-16.

**MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99: 1-12.

**MACHADO, C.A.; AYALA, F.J.** 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 7396-7401.

**MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; POVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; PRATA, A.; MACEDO, V.** 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease?. Lancet. 1: 1338-1340.

**MIRANDA, S.** 2007. Tipificación mediante microsatélites de los clones de *Trypanosoma cruzi* presentes en triatominos y pacientes chagásicos crónicos chilenos. Memoria Título Biólogo. Santiago, Chile. U. Arturo Prat, Depto. Ciencias del mar. 12-42 p.

**OLIVEIRA, R.P.** 1997. Estudos Genéticos e Evolucionários do *Trypanosoma cruzi*. Tesis PhD. Belo Horizonte, Brasil. U. Federal Minas Gerais.

**OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D.J.** 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 3776-3780.

**PAHO (Pan American Health Organization).** 1994. Chagas disease and the nervous system. Scientific Publication N° 547.

**PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.M.; PAETKAU, D.; BAUDOIN, L.; ESTOUP, A.** 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. pp. 536-539.

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

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

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

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

**SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.D.C.; BORGOÑO, J.M.; MATURANA, R.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; TELLO, P.; VILLARROEL, F.** 1991. Panorama general de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Bol Chil Parasitol. 46: 19-30.

**SCHMIDT, J.; KLEFFMANN, T.; SCHAUB, G.A.** 1998. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. Parasitol Res. 84:527-536.

**TAKEZAKI, N.; NEI, M.** 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. Genetics. 144: 389-399.

**TIBAYRENC, M.; AYALA J.F.** 1991. Towards a population genetic of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol Today. 7: 228-232.

**TIBAYRENC, M.** 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetoplastid Biology and Disease. 2:12.

**VENEGAS, J.; COÑOEPAN, W.; PICHUANES, S.; MIRANDA, S.** 2009. Phylogenetic analysis of microsatellite markers further supports the two hybridization events hypothesis as the origin of the *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol Res.* 105: 191-199.

**VENEGAS, J.; MIRANDA, S.; COÑOEPAN, W.; PICHUANES, S.; JERICIC, M.I.; GONZÁLEZ, C.; GAJARDO, M.; APT, W.; ARRIBADA, A.; SÁNCHEZ, G.** 2010. Microsatellite marker analysis shows differentiation among *Trypanosoma cruzi* populations of peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on the same chronic chagasic patients. *Parasitol Res.* 107: 855–863.

**VENEGAS, J.; ROJAS, T.; DÍAZ, F.; MIRANDA, S.; JERIC, M.; GONZALES, C.; COÑOEPÁN, W.; PICHUANES, S. RODRÍGUEZ, J.; GAJARDO, M.; SÁNCHEZ, G.** 2011. Geographical structuring of *Trypanosoma cruzi* populations from Chilean *Triatoma infestans* triatomines and their genetic relationship with other Latino American counterparts. (*Pathogens and Global Health*, en prensa)

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

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

**WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION).** 2000. Chagas Disease interrupted in Chile. *TDR News.* 61: 10.

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

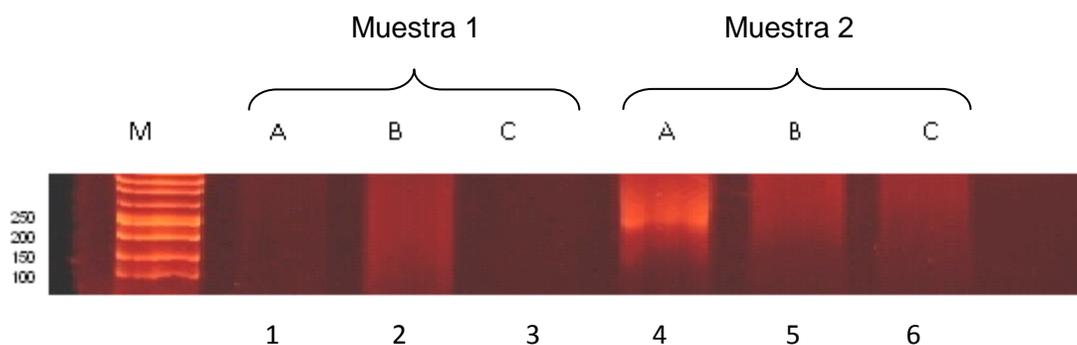
**ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES M. A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G.** 2009. A new consensus for *T. cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 1051– 1054.

## Anexos

### Anexo 1. Marcadores microsatélites y partidores utilizados para su amplificación.

Marcador	Pares de bases de alelos	Secuencia repetida	Partidores para PCR
<b>SCLE10</b>	200-300	(GT)2(TG)10	1 GATCCCGCAATAGGAAAC
			2 GTGCATGTTCCATGGCTT
<b>SCLE11</b>	100-200	(AC)9	1 ACGACCAAAGCCATCATT
			2 GATGCTAACTGCTCAAGTGA
<b>MCLE01</b>	100-200	(CA)9	1 CTGCCATGTTTGATCCCT
			2 CGTGTACATATCGGCAGTG

### Anexo 2. Gel de poliacrilamida al 15% teñido con bromuro de etidio.



Fragmento de un gel de poliacrilamida donde se observa el resultado de una corrida electroforética de 2 muestras de *T. cruzi* amplificadas mediante PCR, para el análisis de los marcadores microsatélites SCLE10 (A), SCLE11 (B) y MCLE01 (C), utilizando un marcador de peso molecular de 50 pares de bases. En el cuarto carril se observa una banda de 250 pares de bases, correspondiente a la amplificación del marcador microsatélite SCLE10.

**Anexo 3. Distancias genéticas poblacionales Dc y Da obtenidas mediante el programa MSA versión 4.0.5.**

Dc	III	V	RM	San	Xen	Tcl	Tcll	TcIII	H
III	0.00000	0.69218	0.73079	0.77753	0.79427	0.76899	0.76001	0.77227	0.77087
V	0.69218	0.00000	0.61581	0.67266	0.64715	0.57081	0.67677	0.71366	0.66735
RM	0.73079	0.61581	0.00000	0.73574	0.72342	0.72204	0.72906	0.81417	0.78692
San	0.77753	0.67266	0.73574	0.00000	0.54778	0.65571	0.72782	0.79867	0.77870
Xen	0.79427	0.64715	0.72342	0.54778	0.00000	0.71352	0.75710	0.82063	0.80946
Tcl	0.76899	0.57081	0.72204	0.65571	0.71352	0.00000	0.63747	0.69544	0.59126
Tcll	0.76001	0.67677	0.72906	0.72782	0.75710	0.63747	0.00000	0.59977	0.47944
TcIII	0.77227	0.71366	0.81417	0.79867	0.82063	0.69544	0.59977	0.00000	0.64161
H	0.77087	0.66735	0.78692	0.77870	0.80946	0.59126	0.47944	0.64161	0.00000

Da	III	V	RM	San	Xen	Tcl	Tcll	TcIII	H
III	0.00000	0.59870	0.66270	0.74684	0.78531	0.73372	0.71750	0.73710	0.73430
V	0.59870	0.00000	0.46786	0.56587	0.54130	0.40984	0.57515	0.63330	0.55682
RM	0.66270	0.46786	0.00000	0.66914	0.65541	0.64732	0.66349	0.81840	0.77044
San	0.74684	0.56587	0.66914	0.00000	0.41169	0.53406	0.65621	0.78768	0.75183
Xen	0.78531	0.54130	0.65541	0.41169	0.00000	0.63761	0.71408	0.83372	0.81550
Tcl	0.73372	0.40984	0.64732	0.53406	0.63761	0.00000	0.52251	0.60656	0.45201
Tcll	0.71750	0.57515	0.66349	0.65621	0.71408	0.52251	0.00000	0.46764	0.28379
TcIII	0.73710	0.63330	0.81840	0.78768	0.83372	0.60656	0.46764	0.00000	0.54221
H	0.73430	0.55682	0.77044	0.75183	0.81550	0.45201	0.28379	0.54221	0.00000

Distancias genéticas poblacionales Dc y Da obtenidas mediante el programa MSA versión 4.0.5. Para este análisis se consideraron los clones predominantes (CP) de *T. cruzi* de las muestras de triatomíneos provenientes de las regiones de Valparaíso (V), Atacama (III) y Metropolitana (RM) y los CP de *T. cruzi* obtenidos de sangre (San) y xenodiagnóstico (Xen) de pacientes chagásicos crónicos y clones de literatura de linaje conocido (Tcl, Tcll, TcIII y H).