



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

**DISTRIBUCIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi* EN
MICROMAMÍFEROS DE CHILE**

Eduardo Andrés Costoya Tolosa

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: Pedro E. Cattán A.
Profesor Titular, Universidad de Chile

FONDECYT 1100339 y 1120122

SANTIAGO, CHILE
2015



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

**DISTRIBUCIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi* EN
MICROMAMÍFEROS DE CHILE**

Eduardo Andrés Costoya Tolosa

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: Pedro E. Cattán Ayala
PROFESOR CONSEJERO: Aldo Solari
PROFESOR CONSEJERO: Galia Ramírez

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS

A mis papás por apoyarme siempre, emocional y financieramente, por su infinita paciencia y por todo lo que me han dado.

A Camila Ihle, por ser mi pilar, columna, arco, suelo y radier. Por ayudarme a pasar cada ramo en la universidad, por empujarme siempre en la dirección correcta, por quebrar mi inercia y por ser la mejor compañía del mundo.

A Cristóbal Costoya por todo el apoyo, cervezas y por ser mi hermano.

A Baco, Fito, Bellota, Merlín y Luna por todo el cariño, pelos, compañía y simplemente por existir.

A Antonella Bacigalupo, por su ayuda indispensable, por todo el tiempo invertido y su siempre buena disposición.

A Pedro Cattán, Aldo Solari y Galia Ramírez por sus comentarios, correcciones, aportes y tutoría durante toda la realización de esta memoria.

ÍNDICE DE CAPITULOS

	Página
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	3
Objetivos	6
General	6
Específicos	6
Material y Método	7
Obtención de Muestras.....	7
Diagnóstico de Infección.....	7
Genotipificación	8
Análisis estadístico.....	9
Resultados	10
Discusión	18
Conclusiones	26
Bibliografía	27

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla Nro. 1. Número de especies capturadas según localidad con hibridación positiva.....	10
Tabla Nro. 2. Linajes de <i>T. cruzi</i> presentes en infecciones únicas y mixtas, por especie de micromamífero.....	12
Tabla Nro. 3. Tipos de infecciones mixtas en muestras positivas de micromamíferos	13
Tabla Nro. 4. Composición de infecciones mixtas encontradas en los micromamíferos más abundantes.....	13
Tabla Nro. 5. Linajes de infecciones únicas y mixtas por localidad de captura	14
Tabla Nro. 6. Composición de infecciones mixtas por localidad de captura.....	16
Tabla Nro. 7. Linajes de infecciones simples y mixtas por estación del año.....	17

ÍNDICE DE GRAFICOS

Página

Grafico Nro. 1: Número de infecciones mixtas totales por localidad.....	15
--	----

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica en Chile y tiene una compleja diversidad genética (enumeradas de TcI a TcVI) con distintas características clínicas y ecogeográficas. Se analizaron 164 muestras de sangre de 9 especies de micromamíferos silvestres (*Abrocoma bennetti*, *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Octodon sp*, *Oligorizomys longicaudatus*, *Phyllotis darwini*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* y *Thylamys elegans*) infectados por este protozoo, provenientes de 6 localidades de la zona centro-norte de Chile. Se utilizó la técnica de DNA blot con hibridación para la detección de la región hipervariable de los minicírculos del kDNA a través de sondas específicas marcadas para los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI. Los resultados fueron sometidos a análisis estadístico.

TcI resultó el linaje más predominante en todas las especies de micromamíferos y en todas las localidades, seguido de TcII, TcVI y TcV respectivamente. *Octodon sp* y *P. darwini* fueron las especies más abundantes en el estudio, con un 85% de muestras positivas a la hibridación. Por otro lado, Til-Til (Región Metropolitana) fue la localidad con mayor número de hibridaciones positivas y mayor cantidad de infecciones mixtas, lo cual fue confirmado estadísticamente con el test de Fisher. En último lugar, se obtuvieron casi cuatro veces más hibridaciones positivas e infecciones mixtas en muestras provenientes de la temporada de invierno, lo cual también fue estadísticamente significativo.

Este estudio confirma la presencia de los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI en la zona centro-norte de Chile, demostrando por primera vez una gran proporción de infecciones mixtas y únicas en la temporada de invierno, así como en las especies *Octodon sp* y *P. darwini*, y especialmente en la localidad de Til-Til, donde se analizan sus posibles causas y efectos.

Palabras clave: Linajes de *Trypanosoma cruzi*, *Octodon sp.*, *Phyllotis darwini*, DNA blot-hibridación, infección mixta.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease is endemic in Chile and has a complex genetic diversity (numbered from TcI to TcVI) with different clinical and eco-geographical features. One hundred sixty four blood samples were analyzed from 9 species of wild mammals (*Abrocoma bennetti*, *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Octodon sp.*, *Oligorizomys longicaudatus*, *Phyllotis darwini*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* and *Thylamys elegans*) infected with this protozoan, from 6 locations of north-central Chile. DNA blot technique followed with hybridization was used to detect the hypervariable region of kDNA minicircle through labeled probes specific for lineages TcI, TcII, TcV and TcVI. Results were then submitted to statistical analysis.

TcI was the most predominant lineage in all mammal species and in all localities, followed by TcII, TcVI and TcV in decreasing order. *Octodon sp.* and *P.darwini* were the most abundant species in the study, with 85% positive hybridization samples. On the other hand, Til-Til (Metropolitan Region) was the town with the highest number of positive hybridizations and mixed infections, which was confirmed statistically with Fisher's test. Finally, nearly four times more positive hybridizations and mixed infections in samples from the winter season were obtained, which was also statistically significant.

This study confirms the presence of the TcI, TcII, TcV and TcVI lineages in the central-northern Chile, demonstrating for the first time a large proportion of mixed and single infections in the winter season as well in the species *Octodon sp* and *P. darwini*, and especially in the locality of Til-Til, where its possible causes and effects are analyzed.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* lineages, *Octodon sp.*, *Phyllotis darwini*, DNA blot-hybridization, mixed infection.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una enfermedad de curso crónico, endémica en nuestro país, y que afecta a más de siete millones de personas a nivel mundial, principalmente en América Latina (OMS, 2015). Esta parasitosis, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, es transmitida principalmente en forma vectorial por insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae a más de 150 especies de mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano (Galuppo *et al.*, 2009).

El parásito es transmitido mediante el contacto de heces de triatominos infectadas por *T. cruzi* con heridas o mucosas del mamífero hospedero. *Triatoma infestans* es el vector responsable del ciclo doméstico en el país (controlado actualmente mediante el uso periódico de distintos productos insecticidas en viviendas en riesgo) y *Mepraia spp.* es responsable del ciclo silvestre y peridoméstico (Campos *et al.*, 2007).

Trypanosoma cruzi puede ser transmitido, además de la forma vectorial, mediante transfusiones sanguíneas, en forma congénita de madre a hijo, trasplante de órganos provenientes de individuos crónicamente infectados, por vía oral, y en último lugar por accidentes de laboratorio (Rassi *et al.*, 2010).

Los signos agudos de la enfermedad son poco frecuentes en Chile y se resuelven espontáneamente a las pocas semanas en el 90% de los individuos. Sin embargo, aunque los signos se resuelvan, el individuo generalmente desarrolla la fase crónica de la enfermedad de Chagas, la cual se presenta de distinta manera dependiendo de la zona geográfica debido a la variedad de cepas infectantes de *T. cruzi*, principalmente en forma de cardiopatías - cardiomiopatía dilatada y arritmias -; en segundo lugar, como enteropatías - megacolon y megaesófago - y en tercer lugar, neuropatías - fundamentalmente neuritis y diversas lesiones a nivel del sistema nervioso central (Rassi *et al.*, 2010).

En Chile varias especies de micromamíferos, en su mayoría roedores, actúan como reservorios de *T. cruzi* debido a su capacidad de ser infectados por triatominos, transformándose así en una constante fuente de infección, al mantener a los triatominos y al parásito en estrecha cercanía con el ser humano (Galuppo *et al.*, 2009). Las especies que

cumplen el rol de reservorio son principalmente *Octodon degus*, *Phyllotis darwini*, *Abrothrix olivaceus* y *Rattus rattus*, este último de especial importancia debido a su relación con el ser humano (Galuppo *et al.*, 2009).

Las distintas subpoblaciones y clones de *T. cruzi* están sometidas constantemente a distintas presiones de selección en sus distintos hospederos, que incluyen una diversidad de especies que actúan como reservorios o vectores. Estas presiones de selección son el resultado de rasgos inherentes a la especie hospedera, pero también se relacionan con aspectos poblacionales e incluso individuales – estatus nutricional, condiciones de estrés, competencia intra e inter-específica – llevando así a una adaptación y diferenciación del parásito, evidenciándose en la manifestación clínica que pueda tener cada cepa específica de *T. cruzi*, haciendo compleja la epidemiología de la enfermedad (Noireau *et al.*, 2009).

En el presente proyecto se busca identificar los diferentes linajes presentes en distintos micromamíferos provenientes de la zona centro-norte de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los animales silvestres representan una fuente de enfermedades zoonóticas y por tanto, en la medida en que los asentamientos humanos invaden zonas silvestres con altos números de vectores y reservorios infectados, el contacto entre humanos y animales infectados se verá probablemente incrementado (Coronado *et al.*, 2009).

En América, más de 150 especies de mamíferos silvestres se han encontrado infectadas naturalmente con *T. cruzi*, y algunos de estos tienen un importante rol en la mantención de los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre del parásito y en la interacción entre ellos (Noireau *et al.*, 2009). En Chile, numerosos estudios han determinado la presencia de *T. cruzi* en mamíferos domésticos y peridomésticos (Rozas *et al.*, 2005).

En zonas hiperendémicas del país, la prevalencia del parásito en mamíferos varía, encontrándose, por ejemplo, un 61% en varias especies de mamíferos nativos (Rozas *et al.*, 2007), y 32% en *Oryctolagus cuniculus* silvestres (Botto-Mahan *et al.*, 2009). Por otro lado, otro estudio encontró una prevalencia de hasta un 59% de infección con *T. cruzi* en ejemplares silvestres capturados de *Phyllotis darwini*, *Octodon degus*, *Abrothrix olivaceus* y *Thylamys elegans*, demostrando en este último la importancia de este marsupial en la mantención del parásito en el entorno silvestre en forma de reservorio (Rozas *et al.*, 2005). En un estudio reciente, se describió la abundancia y prevalencia de *T. cruzi* en reservorios silvestres en seis localidades de la zona centro-norte de Chile en la época invernal. Las especies de micromamíferos capturadas fueron *T. elegans* (75% de prevalencia), *Oligoryzomys longicaudatus* (28,6%), *Abrothrix longipilis* (11,1%), *A. olivaceus* (21,1%), *Octodon* sp. (29,5%), *P. darwini* (44,4%) y *Rattus* sp (46,2%); la prevalencia total varió entre 10,6% y 62,5% por localidad, evidenciándose diferencias significativas entre localidades y entre los valores de prevalencia por especie de micromamífero (Cornejo, 2012).

Trypanosoma cruzi tiene una mitocondria única y especializada, denominado kinetoplasto, el cual contiene DNA (kDNA) dispuesto en maxicírculos, los cuales son la forma análoga del material genético mitocondrial de otras especies eucariontes (25-50 copias por célula), y

kDNA dispuesto en minicírculos, las cuales son pequeñas moléculas compuestas por diferentes clases de secuencias (10.000-20.000 copias por célula) que codifican como guía para ARN, participando así en la edición de los mRNAs de la mitocondria. Los minicírculos están organizados en 4 regiones conservadas de 120 pares de bases (pb) llamadas bloques de secuencia conservada (CSBs), separados por 4 regiones variables de aproximadamente 250 pb cada uno (Junqueira *et al.*, 2005). Algunos oligonucleótidos complementarios a las secuencias conservadas de DNA del minicírculo se han utilizado para la detección del parásito por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de sangre o de vectores (Coronado *et al.*, 2009). La amplificación de los minicírculos resulta en un producto de la región variable, compuesto por una secuencia polimórfica, que es útil para la tipificación de *T. cruzi* mediante pruebas de hibridación con un panel de sondas complementarias a regiones variables del kDNA bien caracterizadas. Este método, de alta capacidad de discriminación, ya ha sido validado con un gran número de clones de *T. cruzi* en diferentes escenarios, siguiendo el protocolo de Veas *et al.* (1991), permitiendo la caracterización y el estudio de la relación hospedador-parásito por pruebas de hibridación con sondas linaje-específicas (Coronado *et al.*, 2009).

Las poblaciones del parásito *T. cruzi* poseen una estructura heterogénea compuesta por diferentes linajes, los cuales circulan tanto en el ciclo doméstico como el silvestre, involucrando seres humanos, reservorios mamíferos y vectores (Santos-Mallet *et al.*, 2008). Diferentes variantes genéticas han sido detectadas en variados hospedadores y regiones geográficas. Análisis genotípicos y fenotípicos han llevado a la clasificación de *T. cruzi* en seis subdivisiones genéticas o linajes: TcI – TcVI. Estudios recientes sugieren que TcII, TcV y TcVI están asociados a ambientes domésticos y pacientes con la forma crónica de la enfermedad, mientras que TcIII y TcIV están involucrados principalmente en ciclos silvestres, y TcI participa en ambos ciclos (Zingales *et al.*, 2009). Además de proveer nuevas percepciones en la biología básica y evolución de *T. cruzi*, el estudio genético ha permitido a los investigadores desarrollar y refinar un conjunto de nuevas herramientas para investigar la ecología del parásito, la epidemiología y patogénesis de la enfermedad, así como mejorar la investigación y desarrollo de nuevas drogas y pruebas diagnósticas cepa-específicas para la enfermedad de Chagas (Clayton, 2010).

Estudios previos basados en detección de DNA minicircular por PCR y genotipificación de muestras de sangre provenientes de pacientes crónicos demostraron que TcI, TcII y TcV fueron los linajes más representativos en las áreas hiperendémicas de Chile. El linaje TcVI también fue detectado pero en baja cantidad. Su presencia es variable dependiendo de la especie de mamífero y vector involucrados (Coronado *et al.*, 2009).

Rozas *et al.* (2007) estudiaron la prevalencia y coexistencia de distintos linajes de *T. cruzi* en mamíferos de Chile. En esa oportunidad, la prevalencia de infección con *T. cruzi* en mamíferos silvestres varió desde 46% a 71% (*A. olivaceus*: 71%, *O. degus*: 61%, *P. darwini*: 56%, y *T. elegans*: 46%). En cuanto a la genotipificación, la gran mayoría de los ejemplares presentaron infecciones mixtas; sin embargo, se pueden distinguir tendencias en cuanto a la frecuencia de infección con distintos linajes en cada especie; *Thylamys elegans* fue mayoritariamente infectado por TcI, *P. darwini* con TcI y TcII, *A. olivaceus* con TcII y *O. degus* principalmente con TcI y TcII. Otros linajes presentes en este estudio fueron TcV y TcVI.

Por otro lado, Galuppo *et al.* (2009) encontraron sólo ejemplares de *R. rattus*, *P. darwini* y *O. degus* positivos a la infección, en la localidad de Calera de Tango. La prevalencia de infección fue de 17,6%. Entre los resultados más significativos, se encontró que TcI estaba presente en el 90% de los ejemplares de *R. rattus* positivos (9/10) y TcV se encontró en mayor proporción en *O. degus* (63%); otros linajes representados en menor proporción fueron TcII y TcVI.

Tanto el estudio de Rozas *et al.* (2007) como el de Galuppo *et al.* (2009) son un aporte para poder esclarecer cuáles son los linajes de *T. cruzi* presentes en Chile; sin embargo, presentan limitaciones debido a que se refieren a una sola localidad (Calera de Tango y Reserva Nacional Las Chinchillas, respectivamente).

En la presente Memoria de Título, se analizó la presencia y diversidad de distintos linajes de *T. cruzi* en micromamíferos de sectores endémicos de la zona centro-norte de Chile, con el fin de relacionar linajes del parásito con la zona geográfica, el género y especie de reservorio y la época del año, para así contribuir al conocimiento tanto de la epidemiología como de la ecología de la enfermedad de Chagas en Chile.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la distribución de linajes de *T. cruzi* en reservorios mamíferos naturalmente infectados de la zona centro-norte de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los linajes de *T. cruzi* presentes en distintos micromamíferos.
2. Analizar la presencia de linajes de *T. cruzi* según especie de micromamífero.
3. Analizar la presencia de linajes de *T. cruzi* según zona geográfica.
4. Analizar la variabilidad de la presentación de linajes de *T. cruzi* según época del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se utilizaron 164 muestras de sangre confirmadas como positivas mediante PCR a la infección con *T. cruzi* obtenidas a partir micromamíferos silvestres (*Abrocoma benetti* [2], *Abrothrix longipilis* [2], *Abrothrix olivaceus* [12], *Octodon sp.* [73], *Oligoryzomys longicaudatus* [6], *P. darwini* [52], *Rattus norvegicus* [4], *R. rattus* [9], y *Thylamys elegans* [4]). Los individuos capturados provenían de las localidades de: El Maqui y Reserva Nacional Las Chinchillas (IV Región de Coquimbo); El Sobrante y Putaendo (V Región de Valparaíso) y Til-Til y Calera de Tango (Región Metropolitana), capturados durante dos épocas del año 2011. También se utilizaron muestras obtenidas de ejemplares provenientes de Putaendo, Til-Til y Calera de Tango capturados durante el año 2012. Las muestras de sangre fueron mezcladas con una solución de Guanidina-HCl 6M - EDTA 200mM (GE), se mantuvieron a temperatura ambiente y fueron transportadas al Laboratorio de Ecología, Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, donde fueron almacenadas a 4°C.

Diagnóstico de la Infección

Se utilizó un kit comercial (Quick-gDNA™ MiniPrep, Zymo Research Corporation) para la extracción de DNA a partir 100 µl de sangre mezclada con Guanidina-HCl 6M – EDTA 200mM. El eluido resultante se mantuvo a -20°C hasta su utilización para la realización de la PCR, en la cual se utilizaron 5 µl de eluido de cada muestra en tubos individuales con 27 µl de *Master mix* compuesto por una solución buffer (1X); dATP (0,38mM); dCTP (0,38mM); dGTP (0,38mM); dTTP (0,38mM); MgCl₂ (1,37mM); Paq DNA Polimerasa (1,3U); oligonucleótido 121 (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3') (0,4µM); oligonucleótido 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') (0,4µM) y 19 µl H₂O libre de nucleasas, resultando en un volumen final de 32 µl. Además, se incluyó un control positivo con kDNA purificado de *T. cruzi* y un control negativo con H₂O libre de nucleasas para cada prueba.

La amplificación se realizó en un termociclador con un protocolo compuesto por: 1 ciclo de 1 minuto a 98°C, 1 ciclo de 2 minutos a 64°C, seguidos de 33 ciclos a 94°C por 1 minuto y 64°C por 1 minuto, y 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos. Para visualizar los resultados, 10

µl de cada amplificado se mezcló con 1,5 µl de buffer de carga y posteriormente se cargaron en un gel de agarosa al 2% teñido con *GelRed* (tinción para ácidos nucleicos). Además, se colocó un marcador de peso molecular escalonado de hasta 100 pb en el primer carril. Las muestras fueron sometidas a electroforesis a 100 Volts por 60 minutos. El resultado de la amplificación se determinó positivo cuando al observar el gel de agarosa en un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm) se observó la presencia de una banda de 330 pares de bases en el carril respectivo, lo que corresponde al kDNA de las regiones variables de los minicírculos de *T. cruzi*. Se consideró como positiva una muestra cuando en 2 amplificaciones distintas se observaron resultados positivos; si hubo resultados discordantes (positivo/ negativo), se realizó una tercera amplificación y visualización para dirimir.

Genotipificación

Se utilizaron 40 µl del amplificado de muestras positivas al diagnóstico por PCR, los cuales se sometieron a electroforesis en 4 geles de agarosa al 2% idénticos; se colocaron 10 µl de cada muestra en el mismo carril de cada uno de los geles, además de 2 µl de marcador de peso molecular en el primer carril. Luego de la electroforesis se realizó un DNA-Blot, el cual permite la transferencia del DNA que está en el gel de agarosa a membranas de nylon ionizadas positivamente (*Hybond N+*), las cuales estaban identificadas y rotuladas, de modo de determinar la localización de cada muestra en la membrana luego de la transferencia. El protocolo fue el siguiente: se realizaron 2 lavados al gel en agitación a temperatura ambiente de 20 minutos cada uno con 500 ml de solución denaturante (NaCl 1,5M + NaOH 0,5M) para denaturar el DNA (mono hebra). A continuación se realizaron 5 lavados al gel en baños en agitación con agua destilada (app. 500 ml por baño) y después 2 lavados más de 20 minutos cada uno nuevamente con 500 ml de solución neutralizante (Tris 1,5M pH 7,4 + NaCl 1,5M); posteriormente el gel se montó sobre un papel filtro del mismo ancho del gel de agarosa, el cual estaba ubicado sobre un puente de vidrio colocado sobre una fuente del mismo material, la cual contenía 500 ml de solución citrato (NaCl 0,3M + citrato de sodio 0,03M); el papel filtro tenía sus extremos inmersos en esta solución. Luego del papel filtro y el gel, se colocó la membrana correctamente rotulada en forma de calco sobre el gel, luego otro papel filtro con las mismas medidas del gel, y luego una pila de servilletas, las cuales permitieron que la solución citrato suba por efecto de

capilaridad, arrastrando el DNA desde el gel hacia la membrana. Se dejó toda la noche, y al día siguiente la membrana se irradió por 1,5 minutos con luz UV para fijar el DNA en un *Crosslinker* (Vilber Lourmat Bio-Link - BLX®). Luego, cada una de las membranas se guardó en sobres de papel debidamente rotulados.

Las membranas se llevaron al Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, para ser pre-hibridadas por 2 horas a 55°C. Se usaron clones de *T. cruzi* con distintas cepas (TcI, TcII, TcV y TcVI) como moldes de DNA para poder generar sondas específicas marcadas con fósforo radioactivo (³²P) (Veas *et al.*, 1991). Estas sondas contenían los oligonucleótidos que se unen a los sectores variables del minicírculo CV1 y CV2, sin presentar la región constante que genera hibridación con minicírculos de las otras cepas. Estas sondas fueron hibridadas con las membranas en condiciones de alto rigor para asegurar la especificidad en la unión entre la sonda y la muestra ubicada en la membrana. Como controles positivos se utilizaron los mismos clones de *T. cruzi* nombrados anteriormente, y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. Finalmente, se lavaron 3 veces por 30 minutos cada membrana con buffer SSC 2X a 55°C y se analizó el resultado con el *Molecular Imager FX™*, donde se visualizó la radioactividad de la sonda en caso de unión efectiva con la muestra fijada a la membrana.

Análisis Estadístico

Se tabularon los resultados obtenidos para cada muestra al ser hibridadas con las distintas sondas. Se generaron tablas de resumen por especie, localidad y estación.

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar la proporción de infecciones simples y mixtas entre los distintos ejemplares de micromamíferos, y también para detectar diferencias en las proporciones de los linajes según especie, localidad y estación.

RESULTADOS

Resultados Generales

De las 164 muestras confirmadas como positivas y transferidas para la hibridación con sondas específicas, 46 de ellas no presentaron control positivo efectivo (es decir, el control positivo resultó negativo) por lo que no fueron consideradas, dejando así un total de 118 muestras consideradas (71,9%). De estas 118 muestras, 65 (55%) no hibridaron con ninguna de las cuatro sondas, quedando 53 muestras que hibridaron con al menos una sonda.

Para facilitar la comprensión de los resultados con hibridación positiva, se tabularon las distintas especies de micromamíferos con su localidad de captura en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Número de especies capturadas según localidad con hibridación positiva.

LOCALIDAD DE CAPTURA							
ESPECIE DE MICROMAMÍFERO	El Maqui	Reserva Nacional Las Chinchillas	El Sobrante	Putando	Til-Til	Calera de Tango	TOTAL
<i>A. bennetti</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. longipilis</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. olivaceus</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Octodon sp.</i>	2	3	2	6	5	0	18
<i>O. longicaudatus</i>	1	0	1	0	0	0	2
<i>P. darwini</i>	4	6	1	2	13	1	27
<i>R. norvegicus</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. rattus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>T. elegans</i>	0	1	0	0	1	1	3
TOTAL	8	10	4	9	19	3	53

Considerando el conjunto de infecciones únicas y mixtas, el linaje TcI fue el más abundante (43,8%), seguido de TcII (24,7%), TcVI (19,1%) y finalmente TcV (12,4%). Del total de 53 muestras, 31(58,5%) estuvieron asociadas a infecciones únicas, mientras que sólo 22 (41,5%) estuvieron presentes en forma mixta. Por otro lado, al analizar la frecuencia de infecciones mixtas y únicas por linaje, se observó que TcI se presentó en similar proporción en infecciones únicas y mixtas (51,3% vs 48,7%) convirtiéndose en el linaje con menor porcentaje de infecciones mixtas. Por el otro lado TcVI fue el linaje que se presentó en mayor proporción en infecciones mixtas (94%) y sólo se presentó en forma aislada en una muestra.

Resultados por Especie

Dentro de las nueve especies estudiadas, ninguna de las muestras provenientes de especímenes de *A. bennetti* y *R. norvegicus* hibridó con alguna de las sondas específicas. *Abrothrix sp* presentó muestras sólo con TcI mientras que *R. rattus*, presentó sólo una hibridación correspondiente a TcII.

En cuanto a *Octodon sp.*, un 44% (n=41) de las muestras hibridaron con al menos una sonda. Esta especie presentó muestras infectadas con los cuatro linajes, encontrándose infecciones únicas sólo por el linaje TcI. Cabe destacar que en este roedor se observó además mayor proporción de infecciones por el linaje TcI, seguido de TcVI, TcII y por último TcV, escapándose del patrón general descrito previamente, en el que TcI es seguido por TcII.

En relación a *O. longicaudatus*, un 33% (n=6) de las muestras hibridaron con al menos una sonda. Esta especie no presentó infecciones con el linaje TcII, pero sí una infección simple por TcV y una infección mixta compuesta por TcI-TcVI.

P. darwini fue la especie con más muestras con hibridaciones positivas con un 57% (n=47), teniendo mayor cantidad de TcI, seguido de TcII, TcVI y por último TcV. En esta especie también se observó que el linaje TcV sólo se encontró en infecciones mixtas.

Finalmente, de las muestras del marsupial didelfimorfo *T. elegans*, un 75% (n=4) hibridó con al menos una sonda. Esta especie sólo presentó infecciones por TcI y TcII, de las cuales dos eran infecciones aisladas de TcI, y una era una infección mixta TcI-TcII.

Estos resultados se muestran con mayor detalle en la tabla N°2.

Tabla N°2. Linajes de *T. cruzi* presentes en infecciones únicas y mixtas, por especie de micromamífero

Especie de Micromamífero	Total consideradas	Total con hibridación (+)	TcI	TcII	TcV	TcVI
<i>Octodon sp.</i>	41	18	12 (6*, 6**)	3**	2**	7**
<i>P. darwini</i>	47	27	21 (9*, 12**)	14 (4*, 10**)	6**	9 (1*, 8**)
<i>A. bennetti</i>	2	0	0	0	0	0
<i>A. longipilis</i>	2	1	1*	0	0	0
<i>A. olivaceus</i>	7	1	1*	0	0	0
<i>O. longicaudatus</i>	6	2	1**	0	1*	1**
<i>R. norvegicus</i>	3	0	0	0	0	0
<i>R. rattus</i>	6	1	0	1*	0	0
<i>T. elegans</i>	4	3	3(2*, 1**)	1**	0	0

*= Infección única

**= Infección Mixta

Dentro de los micromamíferos que presentaron infecciones mixtas, se obtuvo que *O. longicaudatus* y *T. elegans* sólo presentaron infecciones mixtas dobles, a diferencia de *Octodon sp.* y *P. darwini*, los cuales además presentaron infecciones triples. *Phyllotis darwini* además fue la única especie que presentó infecciones cuádruples. Esta última especie fue la que más tipos y números de infecciones mixtas presentó. Cabe destacar también que en las dos especies más abundantes en el estudio, menos del 50% de las muestras positivas corresponden a infección mixta. Estos datos se muestran en la tabla N°3 y 4.

Tabla N°3. Tipos de infecciones mixtas en muestras positivas de micromamíferos*.

Especie de micromamífero	Doble	Triple	Cuádruple	Total Mixtas
<i>Octodon sp.</i>	5	2	0	7
<i>O. longicaudatus</i>	1	0	0	1
<i>P. darwini</i>	4	4	4	12
<i>T. elegans</i>	1	0	0	1
TOTAL	9	6	4	22

*: Se excluyeron las especies sin infecciones mixtas

Tabla N°4: Composición de infecciones mixtas encontradas en los micromamíferos más abundantes*.

	TcI-TcII	TcI-TcV	TcI-TcVI	TcII-TcV	TcII-TcVI	TcV-TcVI	TcI-TcII-TcV	TcI-TcII-TcVI	TcI-TcV-TcVI	TcII-TcV-TcVI	TcI-TcII-TcV-TcVI	TOTAL
<i>Octodon sp.</i>	0	0	5	1	0	0	0	1	0	1	0	7
<i>P. darwini</i>	3	1	0	0	0	0	0	3	1	0	4	12

*: Se excluyó a *O. longicaudatus* y *T. elegans* por su bajo número de muestras en contraste a las especies presentes en la tabla.

Al comparar la proporción de los diferentes linajes de *T. cruzi* entre especies de micromamíferos no se encontraron diferencias significativas en la proporción de los linajes testeados según especie de micromamífero (Prueba exacta de Fisher, $P \geq 0,05$).

Resultados por Localidad

En cuanto a los resultados por localidad, la localidad de El Maqui presentó infecciones con los cuatro linajes, observándose una mayor cantidad de muestras positivas infectadas por TcI, seguido por TcVI, TcV y en último lugar TcII. Cabe destacar que el linaje TcII sólo se presentó en forma de infección mixta en esta localidad. En cuanto a Las Chinchillas, en esta

localidad se encontraron solamente infecciones únicas y sólo por TcI y TcII. A pesar de que en la localidad de El Sobrante presentó una baja cantidad de muestras hibridadas, esta tuvo un predominio de TcII y TcV, seguida por TcI y TcVI. En El Sobrante las muestras infectadas con el linaje TcI sólo se presentaron en forma única, mientras que las infectadas con TcVI sólo se presentaron en forma mixta. En la localidad de Putaendo, TcI tuvo la mayor cantidad de infecciones, seguido por TcII y en último lugar TcVI, ya que esta localidad no presentó ninguna infección con TcV. Es importante destacar que TcVI sólo se encontró en forma de infección mixta en esta localidad. Til-Til fue la localidad con mayor cantidad de muestras hibridadas, la cual presentó la tendencia general de TcI, seguido por TcII y TcVI y en último lugar TcV, encontrándose estos últimos dos linajes sólo en forma mixta. Por último, la comuna rural de Calera de Tango presentó mayor cantidad de infecciones por TcI, seguido por TcII, TcV y TcVI, en igual número. TcII sólo se presentó en forma de infección única, mientras que ambos TcV y TcVI sólo se presentaron en forma de infecciones mixtas. Estos datos se observan en la tabla N°5.

Tabla N° 5: Linajes de infecciones únicas y mixtas por localidad de captura

Localidad	TcI	TcII	TcV	TcVI	Total
El Maqui	5 (2*, 3**)	1**	3 (2*, 1**)	4 (1*, 3**)	13 (5*, 8**)
Las Chinchillas	7*	3*	0	0	10*
El Sobrante	1*	2 (1*, 1**)	2 (1*, 1**)	1**	6 (3*, 3**)
Putaendo	7 (4*, 3**)	3 (2*, 1**)	0	4**	14 (6*, 8**)
Til-Til	17 (5*, 12**)	12 (1*, 11**)	5**	7**	41 (6*, 35**)
Calera de Tango	2 (1*, 1**)	1*	1**	1**	5 (2*, 3**)
Totales	39 (20*, 19**)	22 (8*, 14**)	11 (3*, 8**)	17 (1*, 16**)	89 (32*, 57**)

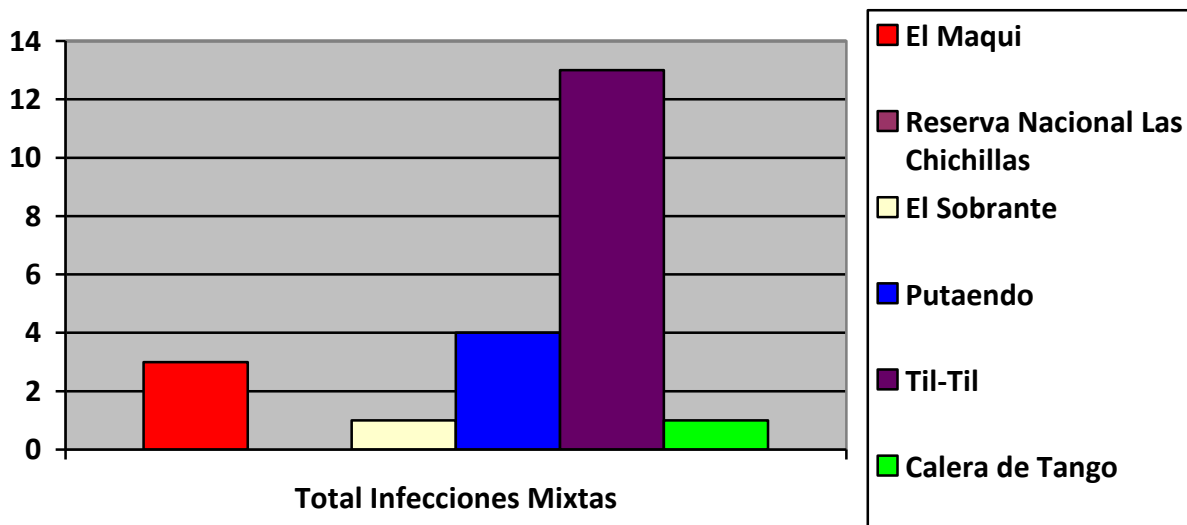
*= Infección única

**= Infección Mixta

Dentro de las localidades que presentaron infecciones mixtas se obtuvo que tanto El Sobrante como Calera de Tango presentaron una infección triple única, mientras que El

Maqui presentó solamente infecciones dobles y una cuádruple. Por otro lado, Putaendo presentó infecciones dobles y triples pero ninguna infección cuádruple. Por último, Til-Til fue la única localidad que presentó todos los tipos de infección mixta, con una mayor cantidad de infecciones dobles y luego triples y cuádruples con el mismo número. Esta localidad tuvo la mayor cantidad de tipos y número de infecciones mixtas dentro de las localidades estudiadas. A continuación se graficaron el total de infecciones mixtas por localidad.

Grafico N°1: Número de infecciones mixtas totales por localidad.



En cuanto a la composición de infecciones mixtas por localidad, cabe destacar de entre los resultados que Til-Til concentró casi la totalidad de las infecciones cuádruples provenientes de *P. darwini*, a excepción de una única muestra obtenida en la localidad de El Maqui. Los datos de composición de las infecciones mixtas por localidad se entregan en la tabla N° 6.

Tabla N°6: Composición de infecciones mixtas por localidad de captura.

Localidad	TcI-TcII	TcI-TcV	TcI-TcVI	TcII-TcV	TcII-TcVI	TcV - TcV I	TcI-TcII-TcV	TcI-TcII-TcVI	TcI-TcV-TcVI	TcII-TcV-TcVI	TcI-TcII-TcV-TcVI
El Maqui	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
El Sobrante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Putando	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0
Til-Til	4	1	1	1	0	0	0	3	0	0	3
Calera de Tango	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Total	4	1	6	1	0	0	0	4	1	1	4

Al comparar la composición de infecciones por linajes de *T. cruzi* con la localidad de captura a través de la prueba exacta de Fisher, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para TcI (P=0,01), TcII (P=0,012), TcV (P=0,008), TcVI (P=0,043), TcI-TcII (P=0,037) infecciones dobles totales (P=0,027) y cuádruples totales (P<0,001), todas con mayor proporción en Til-Til. Por otro lado, en TcI-TcV (P=0,763), TcII-TcV (P=0,763), TcI-TcVI (P= 0,287), TcI-TcII-TcVI (P= 0,354), TcI-TcV-TcVI (P= 0,186), TcII-TcV-TcVI (P=0,076), infecciones triples totales (P=0,305) e infecciones triples cuádruples totales (P=0,171) no hubo diferencias estadísticamente significativas por localidad.

Al realizar la Prueba exacta de Fisher comparando la composición de linajes de *T. cruzi* con la localidad de captura, considerando por separado sólo las muestras provenientes de *P. darwini* y *Octodon sp.* (especies más abundantes en el estudio), se encontraron diferencias significativas sólo para la especie *P. darwini*. Esta presentó diferencias en la proporción del linaje TcI (P=0,001) siendo más abundante en la localidad de Til-Til; TcV (P=0,031) siendo más abundante en Til-Til y el Maqui; TcI-TcV-TcVI (P=0,021) siendo más abundante en Calera de Tango; y por último en infecciones mixtas totales (P=0,002) siendo estas más abundantes en la localidad de Til-Til.

Resultados por Estación del Año

Para este análisis sólo se consideraron los resultados de las muestras de sangre que fueron tomadas en invierno y verano del año 2011. En términos de resultados generales se detectaron cuatro veces más hibridaciones en invierno que en verano; además, no se observaron infecciones mixtas durante la estación de verano, mientras que en la estación de invierno representaron el 74,6% del total de infecciones. En la estación de verano no se observaron infecciones con los linajes TcV y TcVI, mientras que en invierno hubo infecciones con todos los linajes del estudio. Se observó un predominio general de TcI, seguido por TcII, en ambas estaciones. Estos datos se encuentran en la tabla N° 7.

Tabla N° 7: Linajes de infecciones simples y mixtas por estación del año.

Estación	TcI	TcII	TcV	TcVI	Total
Verano 2011 (12)	8*	4*	0	0	12*
Invierno 2011 (33)	23 (8*, 15**)	17 (4*, 13**)	11(3*, 8**)	12 (1*, 11*)	63 (16*, 47**)

*= Infección única

**= Infección Mixta

Al comparar la composición de linajes de *T. cruzi* con la estación de captura, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todos los linajes (TcI P=0,003; TcII P=0,003; TcV P=0,001; TcVI P<0,001) y para las infecciones dobles totales (P=0,027), siendo estos más representados en la estación de invierno

Se comparó la proporción de los linajes por estación del año, para *Octodon sp.* y *P. darwini* por separado (especies más abundantes en el estudio). En *Octodon sp.* se encontraron diferencias significativas para el linaje TcII (P=0,033), TcV (P=0,03) e infecciones mixtas totales (P=0,03. Para el caso de *P. darwini*, sólo se encontró diferencia significativa en la proporción de TcVI (P=0.018) y de infecciones mixtas totales (P=0.004).

DISCUSIÓN

Este estudio confirma la presencia de los linajes de *T. cruzi* TcI, TcII, TcV y TcVI en la zona centro-norte del país, concordando a nivel general con otros estudios realizados en Chile (Torres *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2012; Bacigalupo *et al.*, 2012). Además, se demuestra que TcI, seguido de TcII, son los linajes más prevalentes, lo que también se condice con estudios anteriores en micromamíferos (Campos *et al.*, 2007; Rozas *et al.*, 2007).

Gracias a los continuos esfuerzos desde el año 1991 para erradicar la transmisión vectorial por parte de los países del Cono Sur, se puede plantear que los principales focos de infestación del ambiente doméstico, serían los triatomíneos del ciclo silvestre (Fuenzalida, 2014). Dado que, en base a que TcI resultó el linaje más abundante en reservorios del ciclo silvestre, existiría, por lo tanto, una mayor probabilidad de transmisión de este linaje hacia los seres humanos y animales domésticos, lo cual es respaldado en el estudio de Coronado *et al.* (2006). Esto es importante debido a que el linaje TcI se ha asociado a cardiopatía chagásica severa y a una mayor resistencia a drogas, tales como el benznidazol, alopurinol e itraconazol, como tratamiento para la enfermedad de Chagas (Coronado *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2015; Cura y Schijman, 2013).

Es importante destacar que en este estudio el linaje prevalente en la mayoría de las especies fue TcI, seguido por TcII, TcVI y TcV respectivamente. Este predominio general de TcI difiere de estudios anteriores, donde se encontró TcII como linaje predominante (Galuppo *et al.*, 2009; Rozas *et al.*, 2007). Tradicionalmente, el linaje TcII se ha asociado a ambientes domésticos de Sudamérica (Macedo *et al.*, 2004), y a pesar de que las asociaciones estrictas entre linajes y ciclos son cada vez menos claras, el predominio de TcII en micromamíferos de estudios previos podría deberse a que los micromamíferos analizados provenían de zonas con mayor cercanía a ambientes domésticos que los utilizados en este estudio, como es el caso de Rozas *et al.*, (2007) donde los micromamíferos utilizados fueron capturados en zonas en las que también se encontraban caprinos, equinos, y bovinos domésticos.

Por otro lado, el predominio del linaje TcI en micromamíferos silvestres de la zona centro-norte de Chile puede deberse a la asociación frecuente de este linaje en ciclos silvestres de Sudamérica tras años de coevolución entre linajes-vectores y hospederos (Noireau *et al.*,

2009); o a que los métodos de detección en sangre utilizados tengan una mayor sensibilidad y especificidad ante TcI, tal como se vio en un estudio realizado en humanos donde se observó que TcI tiene una mayor tendencia a encontrarse en sangre con respecto a otros linajes (Coronado *et al.*, 2006). A lo anterior se suma que en un estudio de triatomíneos silvestres capturados en las mismas localidades del estudio actual, TcI también resultó el linaje predominante, tanto en *T. infestans* como en *M. spinolai* (Ihle, 2014), siendo esperable por lo tanto, que en los reservorios predominara ese linaje.

En el caso particular de la especie *T. elegans*, este corresponde a una especie de la familia Didelphidae, la cual ha sido tradicionalmente asociada al linaje TcI. Esto se atribuye a una relación evolutiva entre los marsupiales americanos, principalmente del género *Didelphis* y este linaje (Noireau *et al.*, 2009). Se ha visto que en condiciones experimentales, especies como *Didelphis aurita* han logrado mantener infecciones estables por TcI, mientras eliminan aislados de TcII. Algo similar ocurre en animales naturalmente infectados (Noireau *et al.*, 2009). Este patrón de asociación entre la especie *T. elegans* y TcI tendió a mantenerse en este estudio a pesar de las pocas muestras analizadas, ya que presentó dos infecciones únicas por TcI y una infección mixta TcI-TcII. Esta asociación con Didelphidae y con armadillos y hormigueros, se considera como de las primeras de *T. cruzi*, llevando muchos años de coevolución y estableciendo así patrones estables de relación vector-hospedero (Noireau *et al.*, 2009).

En cuanto al linaje TcV, este se encuentra principalmente ligado a megasíndromes al igual que TcII y TcVI. (Zingales *et al.*, 2012). Generalmente TcV se encuentra descrito como parte del ciclo doméstico en el Cono Sur, donde *Octodon spp.* es uno de los mamíferos silvestres asociados al linaje (Rozas *et al.*, 2007; Galuppo *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012). Sin embargo, en este estudio TcV fue el linaje de menor prevalencia, casi siempre asociado a otro linaje en forma mixta y afectando a *O. longicaudatus*, *P. darwini* y *Octodon sp.* La alta prevalencia de TcV en infecciones mixtas coincide con lo observado en estudios anteriores en zonas endémicas (Zingales *et al.*, 2012).

Las especies de micromamíferos más representados en este estudio fueron *Octodon sp.* y *P. darwini*, los cuales fueron los únicos infectados por los cuatro linajes detectados, siendo *P. darwini* el único que presentó infecciones mixtas cuádruples. Estos resultados coinciden

con estudios anteriores (Rozas *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2007), destacando a estos dos roedores como aquellos con mayor probabilidad de infección en la zona, y mayor variabilidad en cuanto a la composición de la infección por los distintos clones de *T. cruzi* (Galuppo *et al.*, 2009; Rozas *et al.*, 2007). Esto puede deberse a que son las especies de mayor abundancia en la zona, y por lo tanto con mayor probabilidad de ser fuente de alimento para los triatomíneos. Esto último se ha revisado previamente (Alzamora *et al.*, 2007; Rengifo, 2000).

Otro factor a considerar es que ambos roedores tienen distribuciones y ámbitos de hogar muy similares (Iriarte, 2008). Más aun, se ha asociado *Octodon sp.* a la presencia de planta bromeliácea *Puya sp.* (Meserve *et al.*, 1984), y es común encontrar nidos de *P. darwini* en cuevas abandonadas de *Octodon sp.* (Bozinovic *et al.*, 1988). Esto es importante ya que *Puya sp.* está descrita como refugio para *T. infestans* y *M. spinolai*, gracias a sus hojas espinosas y grandes raíces donde los insectos pueden esconderse durante el periodo de inactividad (Bacigalupo *et al.*, 2006). Esta situación plantearía una estrecha relación entre *Octodon sp.*, *P. darwini* y los triatomíneos, predisponiendo a una constante circulación de *T. cruzi*. Esto tendría importancia en zonas rurales donde frecuentemente las viviendas están situadas en cercanías de estos ecotopos, lo que aumentaría la probabilidad de picaduras en seres humanos.

Llama la atención que en este estudio no se haya encontrado resultados positivos en *R. norvegicus*, y sólo una infección única con TcII en *R. rattus*. Estas dos especies tienen mayor probabilidad de contacto con asentamientos humanos, y por tanto pueden conectar el ciclo silvestre con el doméstico (Galuppo *et al.*, 2009). La ausencia de resultados podría explicarse por 1.- el bajo número de muestras provenientes de ambas especies; 2.- la presencia de un subtipo de alguno de los cuatro linajes que no haya podido ser detectada por las sondas utilizadas; y 3.- a que ambas especies son relativamente nuevas en la región, por lo que tendrían un comportamiento distinto frente a las otras especies nativas del estudio, las que han evolucionado durante miles de años en conjunto con *T. cruzi* (Briones *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2007).

Respecto a la proporción de infecciones mixtas, este estudio concuerda con estudios anteriores donde las infecciones únicas fueron más prevalentes que las infecciones mixtas

(Rozas *et al.*, 2007). TcI y TcII fueron los linajes más prevalentes, distribuidos tanto por separado como asociados formando infecciones mixtas, lo cual es consistente con la observación que estos dos linajes son los más puros y ancestrales. Sin embargo, esta agregación no mostró una diferencia significativa con respecto a los otros linajes para sugerir un fenómeno de agregación como ocurre en otras enfermedades parasitarias (Lord *et al.*; Westenberger *et al.*; Rozas *et al.*, 2007). La prevalencia de estos dos linajes es similar a lo que se ha encontrado en pacientes humanos con enfermedad de Chagas crónico, lo que indicaría que estos patrones pueden ser detectados en distintos hospederos mamíferos (Bernabé *et al.*, 2001).

Esta coinfección de distintos linajes en mamíferos silvestres puede ser explicado por reinfecciones en el ambiente silvestre y/o por las presiones selectivas del hospedero hacia los distintos linajes de *T. cruzi* (Herrera *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se observó una clara asociación de linajes entre sí ni con un hospedero en específico, lo que refutaría asociaciones específicas sugeridas en estudios anteriores (Barnabé *et al.*, 2001).

En cuanto a las localidades estudiadas, Til-Til fue la que presentó la mayor cantidad de infecciones con linajes identificados, tanto simples como mixtas, concentrando el 75% de las infecciones cuádruples, lo cual no tiene precedentes en otros estudios de la zona. Si bien esto podría deberse a la mayor cantidad de muestras obtenidas del lugar, esta alta capacidad de hibridación con las sondas radioactivas –por la alta cantidad de kDNA- podría estar dado por condiciones ambientales favorables (temperatura, humedad y disponibilidad de alimento) tanto para el parásito como para los hospederos y los vectores. El clima de la localidad de Til-Til se caracteriza como templado cálido con lluvias invernales, al igual que el clima de Calera de Tango. Ese tipo de clima difiere de los encontrados en las otras localidades, en los cuales se presentan temperaturas mínimas más bajas y menor humedad (Rioseco y Tesser, 2012). Se ha observado en estudios de triatominos que estos requieren temperaturas templadas (entre 16 y 40°C) para sobrevivir (Canals *et al.*, 1998), al igual que roedores como *Octodon sp.* (óptimo entre 17 y 20°C) (Lee, 2004). Por lo anterior es posible que en las localidades de Til-Til y Calera de Tango se produzcan condiciones más favorables para la transmisión de los linajes de *T. cruzi*. A pesar de que en este estudio en la localidad de Calera de Tango la cantidad de muestras fue insuficiente, en un estudio de

triatominos por Ihle (2014), esa resultó la localidad con mayor cantidad de linajes presentes e infecciones mixtas, y junto con la localidad de Til-Til presentaron los mayores índices de diversidad de linajes, lo que podría estar respaldando la hipótesis anterior.

Los resultados obtenidos en este trabajo provenientes de la Reserva Nacional Las Chinchillas concuerdan con estudios anteriores en cuanto a que *P. darwini* y *Octodon* sp. son generalmente las especies con mayor prevalencia de infección por *T. cruzi*. Sin embargo, difiere de los datos obtenidos por Rozas *et al.* (2007) en la misma localidad, donde TcII tuvo igual o mayor prevalencia que TcI en las especies más representadas en el estudio actual (*P. darwini* y *Octodon* sp). Sin embargo, Krestchmer (2010) detectó solamente infecciones por TcI en la misma localidad sin encontrar ningún individuo infectado por TcII, TcV ni TcVI.

En cuanto a la localidad de Putaendo, Krestchmer (2010) detectó solamente TcI en los especímenes testeados, lo cual difiere del estudio actual donde se encontró una prevalencia de TcI, seguido por TcVI, TcII (en ese orden) y sin la presencia de TcV. Sin embargo, no se pueden sacar conclusiones definitivas de estas diferencias debido al pequeño número de muestras del estudio anterior (4 muestras).

Por último, en Calera de Tango el estudio de Galuppo *et al.* (2009) detectó una mayor prevalencia de TcI en *R. rattus*, seguido por TcV, TcII y TcVI. Sin embargo en *P. darwini* sólo se detectó TcV, y en *O. degus* una mayor prevalencia por TcV, TcII y TcI. Esta marcada tendencia hacia TcV en este estudio coincide con el estudio de Ihle (2014) donde Calera de Tango fue la única localidad con el linaje TcV. Krestchmer (2010) encontró TcI en casi la totalidad de los reservorios de Calera de Tango, excepto por dos especímenes de *R. rattus* que presentaron infecciones mixtas compuestas por TcI y TcVI.

Las diferencias entre localidades podrían deberse entre otras cosas a 1.- pequeño tamaño muestral; 2.- la utilización de bandas insuficientes a la electroforesis, donde habría baja cantidad de material genético que dificultaría la hibridación con las sondas específicas; y 3.- la variabilidad ambiental (clima y modificación humana) de las distintas localidades.

Finalmente en cuanto a los resultados por estación, hibridaron cuatro veces más muestras de invierno que de verano, y se encontró una diferencia significativa para la proporción de todos los linajes, siendo estos más representados en invierno. Variaciones temporales de

densidad e infección en vectores y hospederos han sido reportados (Bacigalupo *et al.*, 2010; Botto-Mahan *et al.*, 2010; Ceballos *et al.*, 2005). Sin embargo, en forma general, se ha observado que en estaciones calurosas existe una mayor diversidad de fuentes alimentarias para los triatominos (Canals *et al.*, 2001; Oda, 2012), lo cual lleva a un mayor número y diversidad de infecciones en verano con respecto al invierno, debido al aumento de oferta de alimento para los triatominos (Gürtler *et al.*, 2014; Ihle, 2014), lo cual contrasta lo ocurrido en el estudio actual. A pesar de que esta sobrerrepresentación de linajes en invierno es inusual, podría deberse a múltiples factores. En estudios de *Octodon sp.* se ha observado un aumento de la densidad poblacional en invierno debido al reclutamiento de juveniles y a la estación reproductiva de esa especie que se produce al inicio de la estación lluviosa (Meserve *et al.*, 1984; Lee, 2004). Además, se ha demostrado en especies como *P. darwini* que durante periodos de alta demanda energética como el invierno, son de gran importancia modificaciones conductuales como el agrupamiento social y la construcción de nidos para retardar la pérdida de calor de los individuos (Bozinovic *et al.*, 1988). Este aumento en las densidades y aglomeración de los individuos podría llevar a un acercamiento de las especies con los vectores y facilitar la transmisión del parásito durante la estación lluviosa. Esto podría reflejarse en una mayor variabilidad de linajes. Por otro lado, es probable que en individuos infectados durante el verano y que llegan a la estación de invierno –donde pasan a la fase crónica de la enfermedad, y disminuye la parasitemia por control del sistema inmune (Rassi *et al.*, 2010)- se produzca un aumento de la parasitemia durante el invierno debido a una inmunosupresión (Pereira *et al.*, 1996, Oliveira *et al.*, 2002) por la respuesta de estrés crónico del animal frente a la escasez de alimento (hambre) y las bajas temperaturas de la estación (frío) (Svensson *et al.*, 1998), en adición al consumo de triatominos por parte de los micromamíferos frente a la escasez de alimentos (Rabinovich *et al.*, 2001); todo esto llevaría a una mayor cantidad de DNA de *T. cruzi* en sangre de los animales testeados en invierno, lo cual se reflejaría en mayor número de hibridaciones con las sondas específicas. En último lugar, el aumento de infecciones y linajes durante el invierno podría haber ocurrido debido a que un porcentaje importante de las muestras que no hibridaron provenientes del periodo de verano correspondían a linajes no testeados en el estudio.

Por último, cabe destacar la pérdida progresiva de muestras durante el estudio, y sobretodo el alto número de muestras que no hibridaron con ninguna de las cuatro sondas (55%). Esto podría deberse a varias razones:

1.- Fallas en la etapa de hibridación por el tiempo que el DNA estuvo conservado a -18°C (2 años), cuando lo recomendado es conservarlo a -80°C cuando el periodo de almacenamiento es mayor al año (Baust, 2008). Esto podría haber dañado el kDNA almacenado en la región hipervariable de los minicírculos, impidiendo así su hibridación con alguna de las sondas.

2.- En segundo lugar, no se puede afirmar en forma categórica que las muestras que no hibridaron hayan contenido los linajes TcIII y TcIV. Venegas *et al*, 2013 detectaron el linaje TcIII en *T. infestans* y pacientes chagásicos crónicos. Este estudio se realizó con microsatélites de tres loci, y dicho linaje no se ha vuelto a detectar ni en mamíferos ni en vectores. Según Zingales *et al*. (2012), TcIII y TcIV estarían presentes principalmente en el Amazonas y la zona norte de Sudamérica, por lo que sería extremadamente raro que se encontraran en Chile.

3.- Otra posibilidad es que las muestras que no hibridaron hayan sido ligeramente diferentes genéticamente, lo que impediría su detección por las sondas utilizadas. Esto es especialmente cierto para TcI, el cual cambia según su origen geográfico. Tibayrenc *et al*. 1988, demostraron la heterogeneidad intraespecífica de TcI mediante un esquema de tipificación clonal de isoenzimas, con 25 diferencias genotípicas asociadas a TcI, mientras que en los otros cinco DTU se encontró un número mucho menor. También existe la posibilidad que algunas de las sondas utilizadas durante la hibridación hayan estado alteradas imposibilitando la detección.

4.- En último lugar, y como más importante, cabe destacar la complejidad de la naturaleza de las bandas de DNA provenientes de mamíferos, las cuales tienden a ser más débiles que las obtenidas a partir de triatomos (por la baja parasitemia en sangre) y, por lo tanto disminuye sustancialmente la probabilidad de que las sondas radioactivas puedan fijarse a ellas. Se sugiere que en estudios posteriores se utilicen otras técnicas al analizar linajes de *T. cruzi* en muestras positivas de PCR provenientes de mamíferos con el objetivo de aumentar la sensibilidad para las hibridaciones, como PCR anidado (Nested PCR)

idealmente (Silva, *et al.*, 2008), PCR-RFLP (PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) o tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Messenger *et al.*, 2015)

CONCLUSIONES

- Se confirma la presencia de TcI, TcII, TcV y TcVI como linajes de *T. cruzi* presentes en la zona endémica de Chile.
- Existe una clara predominancia de TcI como linaje en la mayoría de las muestras, seguido por TcII, TcVI y TcV en la mayoría de las especies.
- *Octodon sp.* y *Phyllotis darwini* serían los principales reservorios silvestres de *T. cruzi* en la zona endémica de Chile.
- Til-Til fue la zona con mayor número de hibridaciones, tipos de linajes e infecciones mixtas, lo cual podría darse por las condiciones ambientales, o al bajo número de muestras de las demás localidades.
- Se observó una predominancia notoria y estadísticamente significativa de abundancia y diversidad de linajes de *T. cruzi* en micromamíferos durante la época de invierno, lo cual contradice estudios anteriores, pero podría deberse al aumento de la densidad poblacional de la especie *O. degus* y a la aglomeración de la especie *P. darwini* durante el invierno, facilitando la infección.
- Pese a la cantidad de nueva información generada por este estudio, los resultados presentados podrían no ser definitivos debido a la pérdida de muestras durante el proceso que no hibridaron con ninguna de las sondas diseñadas para el estudio.

REFERENCIAS

- **ALZAMORA, A.; CORREA, P.; GAGGERO, E.; ACUÑA-RETAMAR, M.; CATTAN, P.E.** 2007. Conducta de picada y defecación de *Mepraia spinolai* en dos hospederos frecuentes en su hábitat. *Parasitol Latinoam* 62: 112 -117
- **ARENAS, M.; CAMPOS, R.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2012. *Trypanosoma cruzi* genotypes of insect vectors and patients with Chagas of Chile studied by means of Cytochrome b Gene Sequencing, Minicircle Hybridization, and Nuclear Gene Polymorphisms. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12 (3): 196-205
- **BACIGALUPO, A.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.; ACUNA-RETAMAR, M.; TORRES-PEREZ, F.; CATTAN, P.E.** 2012. Differential Pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. *Am J Trop Med Hyg* 87(3):473–480.
- **BACIGALUPO, A., SEGURA, J.A., GARCÍA, A., HIDALGO, J., GALUPPO, S., CATTAN, P.E.** 2006. First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. *Rev. Med. Chile* 134, 1230–1236.
- **BACIGALUPO, A.; TORRES-PEREZ, F.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; CORREA, J.P.; MORENO, L.; ARROYO, P.; CATTAN, P.E.** 2010. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(5): 633-641
- **BAUST, JG.** 2008. Strategies for the storage of DNA. *Biopreservation and Biobanking* 6:25
- **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: 127–137
- **BOTTO-MAHAN, C.; ACUÑA-RETAMAR, M.; CAMPOS, R.; CATTAN, PE.** 2009. European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are naturally infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 944–946.
- **BOTTO-MAHAN, C.; CAMPOS, R.; ACUÑA-RETAMAR, M.; CORONADO, X.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2010. Temporal Variation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Native Mammals in Chile. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 317-319
- **BOZINOVIC, F.; ROSENMAN, M.; VELOSO, C.** 1988. Termorregulación conductual en *Phyllotis darwini* (Rodentia: Cricetidae): Efecto de la temperatura ambiente, uso de nidos y agrupamiento social sobre el gasto de energía. *Rev Chil Hist Nat* 61: 81-86
- **BRIONES, M.; SOUTO, R.; STOLF, B.; ZINGALES, B.** 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 104:2 pp 219-232.

- **CAMPOS, R.; ACUÑA-RETAMAR, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop* 104: 25–29
- **CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M.C.; FERREIRA, A.; CATTAN, P.E.** 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of chagas disease in Chile. *J Med Entomol* 38(2):303-7
- **CANALS, M.; EHRENELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.E.** 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol dia* 22 (3-4):72-78.
- **CEBALLOS, L.A.; VASQUEZ-PROKOPEC, G.M.; CECERE, M.C.; MARCET, P.L.; GÜRTLER, R.E.** 2005. Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop* 95: 149-159.
- **CLAYTON, J.** 2010. The promise of *T. cruzi* genomics. *Nature* 465: S16–S17.
- **CORNEJO, B.** 2012. Abundancia de vectores y reservorios de la enfermedad de Chagas y sus prevalencias a *Trypanosoma cruzi* en época invernal. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 39 p.
- **CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P. SOLARI, S.** 2009. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmission cycle: the evaluation in the sylvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(4), pp. 656–659.
- **CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ALBRECHT, H.; ROZAS, M.; APT, W.; ORTIZ, S.; RODRIGUEZ, J.; SANCHEZ, G.; SOLARI, S.** 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(6), pp. 1008–1012.
- **CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ROZAS, M.; APT, W.; SANCHEZ, G.; RODRIGUEZ, J.; ORTIZ, S.; SOLARI, S.** 2006. Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (1): 216-219.
- **CURA, C.; SCHIJMAN, A.G.** 2013. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de chagas. *Rev Esp Salud Pública* 86: 9-16.
- **FUENZALIDA, F.** 2014. Enfermedad de Chagas: Situación epidemiológica, Enero-Junio, 2014 (datos provisorios, semanas epidemiológicas 1 a 26) [en línea]. Boletín Epidemiológico Trimestral, Vol. 110, n° 2. <epi.minsal.cl/epi/html/AtlasInteractivos/AtlasBET/2014/ABET_02/CHA_BET2_2014.pdf> [consulta: 12-6-2014]. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud.
- **GALUPPO, S.; BACIGALUPO, A.; GARCIA, A.; ORTIZ, S.; CORONADO, X.;**

- CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 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.
- **GÜRTLER, R.; CECERE, M.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.; CEBALLOS, L.; GUREVITZ, J.; FERNANDEZ, M.; KITRON, U.; COHEN, J.** 2014. Domestic animal hosts strongly influence human-feeding rates of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 8(5): e2894. doi:10.1371/journal.pntd.0002894
 - **HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.; STEVENS, J.R.** 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 15–25
 - **HERRERA, H.; LISBOA, C.; PINHO, A.; OLIFIERS, N.; BIANCHI, R.; ROCHA, F.; MOURÃO, G.; JANSEN, A.** 2008. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the pantanal region, Brazil. 102:11 pp 1133-1139.
 - **IHLE, C.** 2014. Comparación de linajes de *Trypanosoma Cruzi* en *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 39 p.
 - **IRIARTE, A.** 2008. Mamíferos de Chile. Lynx Edicions. Barcelona, España. 420 pp.
 - **JUNQUEIRA, AC.; DEGRAVE, W.; BRANDAO, A.** 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends. Parasitol.* 21: 270–272
 - **KRESTCHMER, C.** 2010. Prevalencia de genotipos de *Trypanosoma cruzi* en micromamíferos, modulada por la presencia de distintos vectores, en sectores endémicos de tres regiones de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 67p.
 - **LEE, T.M.** 2004. *Octodon degus*: A Diurnal, Social, and Long-lived Rodent. *ILAR J* 45 (1): 14-24
 - **LORD, C.; BARNARD, B.; DAY, K.; HARGROVE, J.; MCNAMARA, J.; PAUL, R.; TRENHOLME, K.; WOOLHOUSE, M.** 1999. Aggregation and distribution of strains in microparasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 799–807.
 - **MACEDO, A.; MACHADO, C.; OLIVEIRA, R.; PENA, S.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol. 99:1. Pp 1-12.
 - **MESERVE, P.L.; MARTIN, R.E.; RODRIGUEZ, J.** 1984. Ecología comparativa del roedor caviomorfo *Octodon degus* en dos comunidades mediterráneas de Chile. *Rev Chil Hist Nat* 57: 79-89
 - **MESSENGER, L.; YEO, M.; LEWIS, M.; LLEWELLYN, M.; MILES, M.** 2015. Molecular Genotyping of *Trypanosoma cruzi* for Lineage Assignment and Population Genetics. *Parasite Genomics Protocols.* Vol. 1201: pp 297-337.
 - **NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A.M.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res.* 40:26

- **ODA, E.** 2012. Efecto de la composición de reservorios en el ciclo silvestre del parásito *Trypanosoma cruzi*. Memoria Título Ingeniero en Biotecnología Molecular. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad. 32 p.
- **OLIVEIRA, E.; REIS, J.; GOMES, H.; GUEDES, M.** 2002. Reactivation of Chagas' disease leading to the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome. *Braz. J. Infect. Dis.* Vol. 6:6.
- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2015. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N°340. [en línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>> [consulta : 25-06- 2015]
- **PEREIRA, M.; SANTOS, L.; ARAUJO, M.; BRENER, Z.** 1996. Recrudescence induced by cyclophosphamide of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice is influenced by the parasite strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91(1):7 pp 1-4.
- **RABINOVICH, J.; SCHWEIGMANN, N.; YOHAI, V.; WISNIVESKY-COLLI, C.** 2001. Probability of *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(2), 2001, pp. 125–130.
- **RASSI, A.; RASSI JR, A.; MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas Disease. *Lancet* 375: 1388–402.
- **RENGIFO, A.** 2010. Preferencias alimentarias específicas de *Mepraia spinolai* por vertebrados frecuentes en su hábitat. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
- **RIOSECO, R.; TESSER, C.** 2012. Cartografía Interactiva de los climas de Chile [en línea] Instituto de Geografía. Pontificia Universidad Católica de Chile. <www.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva> [consulta: 02-04-2014].
- **ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A.** 2005. Short report: *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(3): 517–9.
- **ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.;** 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 647–653.
- **SANTOS-MALLET, J.; SILVA, C.; GOMES, S.; OLIVEIRA, D.; SANTOS, C.; SOUSA, D.; PINHEIRO, N.; JUNQUEIRA, A.; GONÇALVES, T.** 2008. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Res.* 103: 1041–1045.
- **SILVA, H.; RAMOS, J.; DE FREITAS, J.; DUFFY, T.; BARTHOLOMEU, D.; OLIVEIRA, R.; CHIARI, E.; VIEIRA, M.; FILHO, G.; SCHIJMAN, A.; FRANCO, G.; MACHADO, C.; JUHNO, S.; MACEDO, A.** 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int. J. Parasitol.* Vol 38:7. Pp 839-850.
- **SVENSSON, E.; RABERG, L.; KOCH, C.; HASSELQUIST, D.** 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional*

Ecology. Vol. 12:6 pp 912-919.

- **TIBAYRENC, M., AYALA, F.** 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease – genetic, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277–292.
- **TORRES, J.P.; 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: 161–168.
- **VEAS, F.; BRENIÈRE, S.F.; CUNY, G, BRENGUES, C.; SOLARI, A, TIBAYRENC, M.** 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.* 37: 73–84.
- **VENEGAS, J.; DIAZ, F.; ROJAS, T.; MIRANDA, S.; JERCIC, M.; GONZALEZ, C.; COÑOEPÁN, W.; VARGAS, A.; PICHUANTES, S.; GAJARDO, M.; RODRIGUEZ, J.; SANCHEZ, G.** 2013. Microsatellite loci-based distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes from Chilean chronic Chagas disease patients and *Triatoma infestans* is concordant with a specific host-parasite association hypothesis. *Acta Parasitol.* 58(2):139-48.
- **WESTENBERGER, J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D.; STURM, N.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527–543.
- **ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; 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 *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 1051-1054.
- **ZINGALES, B.; AQUINO, R.; MORENO, M.; FRANCO, J.; NASCIMENTO, P.; LESSA, S.; NUNES, M.; IENNE, S.; MACHADO, C.; BRANDÃO, A.** 2015. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benzimidazole. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 110(3): 433–444.
- **ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE. S.G.; STURM, N.R.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240–253.