



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

***Trypanosoma cruzi* EN *Mepraia spinolai* SILVESTRE.**
EFFECTOS DEL AYUNO EN LA INFECCIÓN Y SOBREVIVENCIA
DEL VECTOR.

Vanessa Cristina de los Ángeles García Olivares

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

PROFESOR GUÍA: Aldo Gerónimo Solari Illescas
Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 1120122

SANTIAGO, CHILE
2018



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

***Trypanosoma cruzi* EN *Mepraia spinolai* SILVESTRE.
EFECTOS DEL AYUNO EN LA INFECCIÓN Y SOBREVIVENCIA
DEL VECTOR**

Vanessa Cristina de los Ángeles García Olivares

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

Nota Final:

Prof. Guía: Aldo Solari

Profesor Corrector: Galia Ramírez

Profesor Corrector: Pedro Cattán

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas por su colaboración durante la realización de esta tesis, tanto a nivel científico como personal.

Agradecer en primer lugar a mi profesor guía Aldo Solari, por la posibilidad de realizar mi tesis en el ICBM, por su eterna paciencia y dedicación.

A mis profesores correctores Galia Ramírez y Pedro Cattán por su ayuda, preocupación y comprensión en esta etapa tan importante de mi vida.

A Carezza Botto-Mahan por su buena predisposición para resolver mis dudas.

A los miembros del laboratorio y a mis compañeras Angélica López y Gemma Rojo por la contención y ayuda que siempre estuvieron dispuestas a brindarme.

A mi familia que siempre me ha apoyado. Especialmente agradecer a mi madre Patricia Olivares, por ser un pilar fundamental en mi vida y a hijo Ignacio Cádiz por todos esos besos y abrazos que me hicieron salir adelante.

A mis amigos por el aliento constante y por los buenos momentos que brindan a mi vida más allá de la ciencia.

Y finalmente agradecer el apoyo incondicional de José Pedrero, mi compañero de vida, que me ha acompañado en este largo camino.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

Introducción	1
Revisión bibliográfica.....	3
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos	7
Materiales y métodos	8
1. Triatomíneos	8
2. Extracción y detección de kDNA	9
3. Genotipificación.....	10
4. Análisis estadístico	11
Resultados	12
Discusión	20
Conclusiones	24
Anexos	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Número total de muestras y muestras positivas a <i>T. cruzi</i> obtenidas de heces de <i>M. spinolai</i> después de cada alimentación.....	12
Tabla Nro. 2: Variaciones de DTUs presentes en <i>M. spinolai</i>	14
Tabla Nro. 3: Frecuencia de DTUs presentes en <i>M. spinolai</i>	15
Tabla Nro. 4: Porcentajes de <i>M. spinolai</i> infectados con cada DTUs	15
Tabla Nro. 5: Supervivencia de <i>M. spinolai</i> posterior a la quinta y última alimentación	18
Tabla Nro. 6: Número total de triatominos <i>M. spinolai</i> vivos y muertos al momento de realizar cada alimentación	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Genotipificación de <i>T. cruzi</i> en <i>M. spinolai</i>	13
Figura Nro. 2: Genotipos circulantes de <i>T. cruzi</i> en <i>M. spinolai</i>	16
Figura Nro. 3: Porcentajes de supervivencia de <i>M. spinolai</i> según estadio ninfal	17
Figura Nro. 4: Porcentajes de supervivencia de <i>M. spinolai</i> infectados y no infectados	19

RESUMEN

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es un protozoo hemoflagelado llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente por vectores conocidos como vinchucas. En Chile, el ciclo de transmisión silvestre está mediado por vinchucas del género *Mepraia*, las cuales se encuentran parasitadas en distintas proporciones desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del Libertador Bernardo O'Higgins.

Para este trabajo, se recolectaron 176 ejemplares *Mepraia spinolai* en la Reserva Nacional Las Chinchillas durante mayo del 2015. Adultos y ninfas de distintos estadios se alimentaron cinco veces con ratones (*Mus musculus*) libres de infección por *T. cruzi* y se sometieron a dos períodos variables de ayuno entre las alimentaciones. Se detectó *T. cruzi* con DNA extraído de las heces de cada insecto mediante PCR, se genotipificó *T. cruzi* mediante sondas de DNA pertenecientes a los cuatro linajes más frecuentemente encontrados en Chile y se evaluó la sobrevivencia de ninfas y adultos durante el período del experimento.

El porcentaje de infección por *T. cruzi* en *M. spinolai* silvestre fue de 29,27%. Los valores más elevados se encontraron en ninfas III (61%), lo cual permitió diferenciar infecciones únicas y mixtas con los linajes TcI, TcII y TcV. Además, ninfas III presentaron mayor resistencia a los periodos de ayuno. La sobrevivencia de ninfas no parece verse afectada cuando se encuentran infectadas con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos en los distintos grupos de insectos se discutieron respecto de la patogenicidad de *T. cruzi* en *M. spinolai* naturalmente infectados.

Palabras claves: triatominos, vinchucas, genotipos, mortalidad, alimentación.

ABSTRACT

The etiological agent of Chagas disease is a hemoflagellate protozoon called *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted mainly by known vectors such as kissing bugs. In Chile, the cycle of wild transmission is mediated by kissing bug of *Mepraia* genus, which are parasitized in different proportions from Arica and Parinacota region to Libertador Bernardo O'Higgins region.

For this work, 176 bugs *M. spinolai* were collected in Las Chinchillas National Reserve during May 2015. Adults and different nymphs stages were fed five times with *T. cruzi* free infection mice (*Mus musculus*) and underwent two variable periods of fasting between feeds. *Trypanosoma cruzi* was detected by PCR extracting DNA from fecal samples of each insect, *T. cruzi* was genotyped by DNA probes belonging to the four lineages most frequently found in Chile and survival of nymphs and adults during the period of the experiment was evaluated.

Percentage of *T. cruzi* infection in wild *M. spinolai* was 29.27%. The highest values were found in the III nymphs (61%), which allowed to differentiate unique and mixed infections with the TcI, TcII and TcV lineages. In addition, nymphs III presented greater resistance to periods of fasting. Survival of nymphs does not seem to be affected when they are infected with *T. cruzi*. Results with the different groups of insects were discussed regarding the pathogenicity of *T. cruzi* in *M. spinolai* naturally infected.

Keywords: triatomines, kissing bug, genotypes, mortality, feeding.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una de las enfermedades infecciosas que causa mayor impacto en América. Fue descrita por el brasileño Dr. Carlos Chagas, en el año 1909, aunque se sabe que esta enfermedad existe hace por lo menos 8.000 años. Actualmente afecta a 6 millones de personas en los 21 países de América Latina y el 13% de toda la población latinoamericana está en riesgo de adquirir la enfermedad (Molina *et al.*, 2016). En Chile, la población en riesgo se encuentra en áreas rurales y suburbanas desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del Libertador Bernardo O'Higgins, correspondiente a la zona endémica del país (Frías-Lasserre, 2010)

La enfermedad de Chagas cursa con una fase aguda y otra crónica. Luego de la infección, la fase aguda tiene una duración aproximada de dos meses y se caracteriza por una alta parasitemia. Esta fase generalmente es asintomática y puede cursar con fiebre, cefalea, mialgias, disnea, dolor abdominal o torácico. Cuando el parásito invade la musculatura cardíaca, digestiva, o ambas, ocurre la fase crónica, produciendo miocarditis crónicas, arritmias, cardiomegalia o megaesófago y megacolon, respectivamente. En Chile, el 30% de los casos crónicos presentan la forma cardíaca y representan el 80% de las muertes, mientras que el 5-10% presentan megasíndromes, siendo el megacolon el más frecuente (Apt *et al.*, 2008).

El agente infeccioso de la enfermedad es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual posee una gran variabilidad morfológica durante las diferentes etapas del ciclo, existiendo al menos tres formas de vida: tripomastigote, epimastigote y amastigote (Kollien y Schaub, 1997). Además *T. cruzi* posee una alta variabilidad genética, constituyendo diferentes genotipos o linajes (Zingales *et al.*, 2012).

Existen más de setenta géneros de mamíferos que se han encontrado infectados con *T. cruzi*, entre ellos los humanos. Este protozoo es transmitido principalmente por vectores conocidos, en varios países, como vinchucas que son hemípteros de la Subfamilia Triatominae. Existen más de 140 especies de triatominos alrededor del mundo. En Chile se encuentran 4 especies: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardo* y *Mepraia parapatrica*.

Mepraia gajardoi se distribuye en la costa norte de Chile, entre los paralelos 18° y 26° de latitud sur y se encuentra asociada a nidos de aves marinas y cuevas de reptiles (Botto-Mahan *et al.*, 2008).

Mepraia parapatrica se describió como especie en el año 2010. Se distribuye en la Isla Pan de Azúcar, así como en la costa norte de Chile, entre los paralelos 25° y 26° de latitud sur. Se alimenta de aves marinas y lagartos silvestres, similar a *M. gajardoi*. También ha sido recolectada en corrales de cabras, por lo que podría invadir ocasionalmente ambientes peridomésticos como lo hace *M. spinolai* (Frías-Lasserre, 2010).

Mepraia spinolai es una especie endémica que presenta un ciclo de vida silvestre. Su fuente de alimentación principal corresponde a especies como zorros, conejos y otros animales silvestres (Alzamora *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2007; Canals *et al.*, 1998). Se encuentra cercana a zonas habitables por la especie humana y su control no está tan regulado ni estudiado como ocurre con *T. infestans*, especie doméstica distribuida ampliamente en América del Sur. Todos estos antecedentes, sumados a la alta prevalencia de *T. cruzi*, hace de *M. spinolai* un vector biológico potencialmente importante.

La mayoría de los estudios sobre detección de *T. cruzi* están realizados con triatomos criados e infectados bajo condiciones de laboratorio. Debido a que en la naturaleza los triatomos están expuestos a hambruna severa, en esta Memoria de título se trabajó con un grupo silvestre de *M. spinolai* naturalmente infectado, procedente de la Reserva Nacional Las Chinchillas, IV Región, Chile.

Se estudiaron las heces de las vinchucas luego de cinco alimentaciones con ratones (*Mus musculus*) libres de infección por *T. cruzi*. Algunas alimentaciones fueron realizadas cada 40 días y otras luego de periodos variables de ayuno, con el fin de detectar *T. cruzi* mediante PCR, determinar los genotipos circulantes y conocer su efecto patogénico, medido por la sobrevivencia de los triatomos a lo largo del estudio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, posee diferentes formas de vida que se pueden encontrar en el vector biológico y en el hospedador. El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando un triatomino consume sangre de un mamífero que contiene tripomastigotes, los cuales se multiplican como estado no infeccioso de epimastigote en el tracto digestivo del vector y luego de 15 a 30 días, se diferencian al estado infeccioso de tripomastigote metacíclico en el recto. Este estado es eyectado junto con las heces, minutos después de alimentarse, ingresa al hospedador definitivo por las mucosas o por la herida que produjo el triatomino al momento de picar y por medio del torrente sanguíneo, llega a las células del sistema retículo endotelial del hígado, bazo, células de la glía y músculos miocárdico y esquelético. Dentro de estas células se multiplica por fisión binaria, bajo la forma de amastigote hasta producir la ruptura de las células infectadas, liberando tripomastigotes al torrente sanguíneo, los cuales pueden ingresar a otras células. El ciclo termina cuando un triatomino no infectado ingiere sangre de un mamífero infectado (Kollien y Schaub, 1997).

Trypanosoma cruzi pertenece al orden *Kinetoplastida*, orden que se caracteriza por tener una gran mitocondria o kinetoplasto, que contiene al DNA kinetoplastídico (kDNA). Esta red compleja está compuesta por docenas de copias de maxicírculos y miles de copias de minicírculos de DNA. Estos últimos están compuestos por cuatro regiones conservadas y cuatro regiones hipervariables que se ubican intercaladas entre sí. Debido a que son abundantes, se utilizan para la detección y genotipificación del parásito (Avila y Simpson, 1995).

Pese a que *T. cruzi* se clasifica como una sola especie, existe una gran diversidad genética entre las cepas aisladas. Diferentes enfoques experimentales han arrojado genética y biológicamente números variables de subgrupos de *T. cruzi*. Existen dos principales linajes filogenéticos de *T. cruzi*: *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), siendo el segundo linaje subdividido en TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe. Actualmente son designados como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, dentro de la clasificación de linajes conocida como “Unidades Discretas de Tipificación” (DTUs) (Westenberger *et al.*, 2005).

Los DTUs son grupos de poblaciones que están genéticamente relacionadas entre sí, siendo identificables por varios marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (Westenberger *et al.*, 2005; Zingales *et al.*, 2009). En Chile se encuentran los DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI, los cuales pueden ser detectados como infecciones únicas o mixtas (Arenas *et al.*, 2012).

La variabilidad genética que posee *T. cruzi* es una clave determinante en la transmisión y patogénesis de la enfermedad de Chagas (Zingales *et al.*, 2012), por lo cual cobra gran importancia genotipificar los DTUs presentes en *M. spinolai*. La detección de los DTUs se realiza con distintas técnicas, entre ellas se encuentran los análisis electroforéticos de enzimas multilocus o MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), perfiles de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del kDNA o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), análisis de amplificación aleatoria del DNA polimórfico o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), PCR con partidador único específico de baja astringencia o LSSP-PCR (*Low Stringency Single Primer PCR*), tipificación de microsatélites multilocus, genes de rDNA y mini-exón (Muñoz *et al.*, 2013). En esta Memoria de Título la genotipificación de *T. cruzi* se realizó mediante hibridaciones con sondas de minicírculos marcadas con P³² que detectan regiones hipervariables, amplificadas por PCR, específicamente de los DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI.

La transmisión de *T. cruzi* se realiza mediante vectores, transfusión sanguínea, vía transplacentaria (Chagas congénito), vía oral (alimentos contaminados), vía sexual (heridas, esperma o fluidos menstruales), accidentes de laboratorio, manejo de animales infectados o trasplante de órganos. Los vectores son el mecanismo de transmisión más importante, ya que cerca del 80% de la población que adquiere esta enfermedad, lo hace a través de triatomíneos (Coura, 2007). La transmisión mediante vectores es dependiente de la excreción de heces y orina. La cantidad de heces excretadas por las vinchucas está relacionada con la cantidad de sangre ingerida y con el período de inanición (Alzamora *et al.*, 2007).

Existen más de 140 especies de triatomíneos, los cuales pertenecen a la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y se caracterizan por ser hematófagos estrictos. Por lo que probablemente todos son capaces de transmitir la enfermedad de Chagas, aunque muy pocos son epidemiológicamente importantes como vectores, ya que sólo algunas especies poseen la capacidad de adaptarse para vivir en estrecho contacto con los humanos (Schofield

y Galvão, 2009). Se encuentran principalmente en América, y en Chile habitan cuatro especies: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica* (Canals *et al.*, 1998; Frías-Lasserre, 2010).

Triatoma infestans es una especie que se distribuye en más de siete países de América del Sur, es la especie doméstica más ampliamente distribuida junto con *Rhodnius prolixus* (Schofield y Galvão, 2009), por lo tanto, existen numerosos estudios científicos que ocupan como modelo a esta especie. En Chile, la transmisión a través de este vector se encuentra interrumpida en el área domiciliaria desde el año 1999 (OPS, 2004).

Mepraia spinolai es una especie silvestre que sólo habita en Chile, entre los paralelos 26° y 34° de latitud sur, desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 3000 metros sobre el nivel del mar. Es un insecto hematófago oportunista, que se alimenta sin hacer diferencias entre la oferta de presas. Presenta un acentuado polimorfismo sexual, con hembras ápteras y machos ápteros o braquípteros. Su hábitat lo constituyen zonas pedregosas, en especial, grietas, canteras, guaneras, nidos de aves y cuevas de animales. A veces también es posible encontrarlas en corrales y pircas periantrópicas y en asociación con pequeños mamíferos como conejos, chinchillas, vizcachas, zorros, marsupiales, roedores, lagartijas y culebras (Alzamora *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2007; Canals *et al.*, 1998).

Es una especie longeva, presenta un ciclo de vida con cinco estadios ninfales y en laboratorio puede sobrevivir alrededor de 18 meses (Canals *et al.*, 1998). La sobrevivencia de los triatominos se encuentra fuertemente relacionada con la humedad relativa. *T. infestans* aumenta su sobrevivencia con un 90% de humedad, en relación a que si se mantienen con un 60 a 70% de humedad relativa (Schaub y Lösch, 1989). La temperatura tiene la misma importancia en los triatominos; se ha demostrado que el desarrollo de *M. spinolai* es posible a temperaturas entre 15 °C y 42 °C; sobre o bajo las señaladas, son temperaturas letales. Además, presenta un ciclo de temperaturas preferenciales, eligiendo temperaturas más altas, entre las 16 y 20 horas, ya que es una especie diurna con un ciclo de actividad predominante en la fotofase (Canals *et al.*, 1998).

Mepraia spinolai puede sobrevivir periodos prolongados en hambruna, al igual que otros triatominos. Schaub y Lösch (1989), demostraron que, en condiciones de laboratorio, ninfas de *T. infestans* en cuarto estadio no infectadas, sobrevivieron cerca de un año, luego de ser

alimentadas por última vez; quinto estadio, diez meses y ninfas de tercer estadio sobrevivieron hasta nueve meses. Al contrario, en vinchucas infectadas con *T. cruzi*, disminuye considerablemente la resistencia a la hambruna, siendo la sobrevivencia de ninfas de cuarto, quinto y tercer estadio, once, nueve y cinco meses respectivamente. Esto se traduce en una considerable disminución de la sobrevivencia de las vinchucas cuando se encuentran parasitadas por *T. cruzi* (Schaub y Lösch, 1989).

Ejemplares de *M. spinolai* infectados artificialmente con *T. cruzi* muestran una menor sobrevivencia comparadas con vinchucas no infectadas. Veintisiete y 49% de las vinchucas infectadas y no infectadas respectivamente, alcanzaron la madurez. Las mayores diferencias de sobrevivencia se encontraron en el último estadio ninfal, probablemente algunos estadios ninfales de *M. spinolai* sean más tolerantes que otros a la infección. (Botto-Mahan, 2009).

La competencia entre el insecto y sus parásitos por los nutrientes determina que las vinchucas infectadas y que no se han alimentado en un largo periodo de tiempo, se encuentren más hambreadas, trayendo como consecuencia un aumento en el riesgo de transmisión de la infección (Schaub y Lösch, 1989; Schaub, 1994).

Por otro lado, se ha descrito que cuando los insectos infectados con *T. cruzi* se crían en condiciones óptimas de alimentación, la reducción en la cantidad de nutrientes en el vector se compensa por un aumento en el número de eventos de alimentación y/o en el volumen de sangre ingerido. (Schaub, 1992). Considerando a *T. cruzi* no patógeno para sus insectos vectores (Fellet *et al.*, 2014; Schaub, 1992).

Ya que los ensayos citados anteriormente fueron realizados con triatominos criados e infectados bajo condiciones de laboratorio, en esta Memoria de Título se estudiará un grupo silvestre de *M. spinolai* naturalmente infectado, sometido a distintas condiciones de alimentación y hambruna, para así poder evaluar su sobrevivencia y poder tener una visión más real de la interacción parásito – vector en condiciones naturales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las consecuencias del ayuno en la infección natural del vector *M. spinolai* con distintos genotipos de *T. cruzi* y el efecto en su sobrevivencia en condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la presencia de *T. cruzi* en las heces de *M. spinolai* posterior a cada alimentación.
2. Genotipificar *T. cruzi* mediante hibridaciones y determinar los DTUs que se encuentren circulando en los triatomos.
3. Evaluar sobrevivencia/mortalidad en los diferentes estadios ninfales de *M. spinolai* a lo largo del estudio.
4. Determinar la relación existente entre la positividad a *T. cruzi* de *M. spinolai* y su sobrevivencia/mortalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Triatominos

Para realizar el estudio se consideró un grupo de *M. spinolai* perteneciente a la Reserva Nacional Las Chinchillas, IV Región, Chile (Anexo Nro. 1). Esta zona se caracteriza por estar inserta en un clima mediterráneo árido y por la presencia de abundantes hospedadores que incluye aves, reptiles y roedores nativos. Entre los últimos se encuentran el ratón cola de pincel (*Octodon degus*), ratón chinchilla (*Abrocoma benetti*), ratón orejudo (*Phyllotis darwini*), ratón oliváceo (*Abrothrix olivaceus*), ratón de pelo largo (*Abrothrix longipilis*), ratón de los espinos (*Olygorizomys longicaudatus*) y el marsupial nativo yaca (*Thylamys elegans*) (Botto-Mahan *et al.*, 2005a).

Se obtuvo 176 ejemplares de *M. spinolai* desde una zona minera abandonada (31° 29' 49" S, 71° 04' 02" O). Esta zona se caracteriza por ser un sitio pedregoso, con escasa vegetación y actividad humana. (Anexo Nro. 2).

Las vinchucas recolectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Al ingresar al laboratorio, todas las vinchucas fueron alimentadas con ratones de laboratorio *Mus musculus* anestesiados, libres de infección por *T. cruzi*. Luego se ordenaron por estadio ninfal y se colocaron en cubículos plásticos individuales de 3,2 cm x 3,6 cm, para facilitar el posterior análisis de las heces de cada vinchuca. Se mantuvieron en una cámara incubadora a 27 °C, con una humedad relativa del 75% y con un ciclo de 14:10 horas de luz y oscuridad respectivamente. Se recolectaron individualmente las heces durante 40 días, diluidas con agua bidestilada, en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se almacenaron a 4 °C.

Una vez concluido este periodo, se realizó una segunda alimentación y recolección de heces. Luego de un ayuno de 100 días en la cámara incubadora, bajo condiciones de laboratorio adecuadas para su sobrevivencia, las vinchucas se alimentaron por tercera vez.

Posterior a la tercera alimentación, se realizó el segundo periodo de ayuno de 120 días y, por último, entre la cuarta y quinta alimentación, transcurrieron solo 40 días. Se recolectaron las heces en tubos de microcentrífuga de cada vinchuca por separado, después de cada alimentación y se almacenaron a 4 °C (Anexo Nro. 3).

Finalmente, las vinchucas sobrevivientes se dejaron en la cámara incubadora, bajo condiciones de laboratorio adecuadas, descritas anteriormente, pero sin alimento. Se registró la data de muerte de cada triatomino estudiado y se determinó la mortalidad de cada grupo.

La manipulación de los ejemplares *M. spinolai* y su mantención en cautiverio, que incluyó alimentaciones con *Mus musculus*, cumplió con las normas bioéticas básicas de manejo y cuidados que exige el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo Nro. 4).

2. Extracción y detección de kDNA

A todas las muestras obtenidas se les extrajo el kDNA para trabajar con muestras purificadas, eliminando componentes de las heces que podrían actuar como inhibidores y alterar los resultados de este estudio. Para esto se utilizó el kit de extracción *E.Z.N.A.® Blood DNA Midi Kit - OMEGA Bio-tek* que cumple su función al unir específicamente, pero de forma reversible, el kDNA a una columna bajo condiciones óptimas, permitiendo que las proteínas y otros contaminantes sean eliminados. Finalmente, los ácidos nucleicos fluyen fácilmente con agua bidestilada o con un buffer bajo en sal.

Bajo campana de flujo laminar, se tomaron 5 µl de cada muestra purificada y concentrada para amplificar el contenido de kDNA. Las muestras se depositaron en tubos de PCR (tubos de microcentrifuga de 200 µl), los cuales ya tenían adicionados 3 µl de oligonucleótido 121 (5' - AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA -3') y 3 µl de 122 (5' - GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3'), 5 µl de buffer de Taq polimerasa (que contiene concentraciones finales de 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 6,7 mM MgCl₂ y 10 mM 2-mercaptoetanol), 5 µl (0,4 mM) de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 µl de BSA 1%, 4 unidades de enzima Taq DNA polimerasa *Invitrogen™* y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 50 µl.

La amplificación del kDNA fue realizada mediante la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) en un termociclador *Techne® TC-512* durante dos horas. El programa utilizado parte con dos ciclos iniciales de 1 minuto a 98 °C y 2 minutos a 64 °C, seguidos de 33 ciclos de 1 minuto a 94 °C y 1 minuto a 64 °C, para terminar con un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. Las muestras de kDNA purificadas y amplificadas se almacenaron a 4 °C.

Para obtener los resultados de PCR, se prepararon geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se cargaron 10 µl de cada muestra amplificada y mezclada con 4 µl de buffer de carga 6x Azul-celeste, 1 µl de marcador de peso molecular 100 bp *Invitrogen*TM con 2 µl de buffer de carga. Además de un control negativo y un control positivo, con agua bidestilada y kDNA purificado de *T. cruzi* respectivamente, ambos controles mezclados con 4 µl de buffer de carga.

Se realizó electroforesis a 100 v por 40 minutos a cada gel y luego se observó con luz ultravioleta en un transiluminador digital de *Bio Rad*®. El resultado se consideró positivo cuando apareció una única banda al mismo nivel de la banda de 330 pares de bases del marcador de peso molecular, ya que indica la presencia de kDNA de *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2005b).

Todas las muestras fueron amplificadas por lo menos tres veces para poder confirmar los resultados. En muestras negativas, se modificó levemente la cantidad de microlitros a amplificar y se concentró el volumen purificado total.

3. Genotipificación

Una vez identificadas las muestras positivas a *T. cruzi*, se seleccionaron aquellas que mostraron bandas fuertes en dos o más ocasiones y se tipificaron los DTUs presentes. Para esto se realizaron transferencias de kDNA a membranas de nylon por difusión simple e hibridaciones de las membranas con sondas específicas marcadas con fósforo radioactivo, que detectan regiones hipervariables de los genotipos TcI, TcII, TcV y TcVI (generadas de los clones de *T. cruzi* sp104, CBB, NR y v195 respectivamente).

Se realizaron tres geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se cargaron marcadores de peso molecular 100 bp y los resultados positivos de PCR en cuádruplicado. Cada gel se cubrió en dos ocasiones con una solución denaturante (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M) durante 20 minutos en constante agitación, permitiendo la reducción del kDNA a mono-hebra. Luego, se lavó con abundante agua destilada, aproximadamente 5 litros y se cubrió en dos ocasiones con una solución neutralizante (Tris-HCl 1 M pH 7,4 y NaCl 1,5 M) con una agitación constante de 20 minutos cada una.

Posteriormente, cada gel se invirtió sobre un papel filtro *Whatman 3MM*, saturado previamente con una solución SSC 2x (NaCl 3 M, Citrato de Na 0,3 M pH 7) que sirve como puente. Sobre el gel se colocó una membrana de nylon *Amersham Hybond™ -N⁺* y varias capas de papel absorbente. Todo el sistema se presionó con un peso de 1 k aproximadamente durante 24 horas para poder transferir el kDNA por capilaridad desde el gel a la membrana de nylon. Una vez transcurridas las 24 horas, el kDNA fue fijado a la membrana irradiándola con luz ultravioleta en un equipo *Hoefer™ UVC500* por un minuto.

Para la hibridación de membranas con sondas específicas, primero se realizó una prehibridación con una solución SSC 2x, durante 4 horas a 55 °C, en un horno rotatorio para que la solución pudiese distribuirse de manera adecuada. Se eliminó la solución y se agregó solución fresca de hibridación con la sonda específica marcada con P³² previamente desnaturalizada. Las membranas se incubaron toda la noche a 55 °C y luego se lavaron tres veces por 30 minutos a 55 °C con 50 ml de solución SSC 2x y SDS 0,1x (0,1% dodecil sulfato de sodio).

Finalmente, para visualizar las membranas que hibridaron, éstas se expusieron al autorradiógrafo *Molecular Imager FX de Bio-Rad®* según condiciones previamente descritas (Coronado *et al.*, 2009).

Todos los procedimientos de laboratorio se realizaron cumpliendo con las normas básicas de bioseguridad que exige la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo Nro. 5).

4. Análisis estadístico

Se consignaron los ejemplares *M. spinolai* muertos mensualmente y se analizaron todos los grupos en una curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier (*Graph Pad Prism*). Se incluyeron todos los triatominos infectados y no infectados de cada grupo en una prueba de Wilcoxon para comparar la relación entre presencia del parásito y la sobrevivencia de los triatominos.

RESULTADOS

Las vinchucas recolectadas en la Reserva Nacional Las Chinchillas, se alimentaron en cinco ocasiones. Posterior a cada alimentación, se recolectaron las heces de cada vinchuca por separado, en tubos de microcentrífuga, logrando obtener un total de 495 muestras de heces. Estas muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR, detectando 110 muestras positivas a *T. cruzi*. Las muestras fueron amplificadas al menos en 3 ocasiones.

El porcentaje de infección por *T. cruzi*, luego de la primera alimentación, fue de 29,27%, cifra que disminuye a 10%, luego de la segunda alimentación, pero que vuelve a aumentar a 30%, luego de la tercera alimentación. Finalmente, este porcentaje disminuye entre la cuarta y quinta alimentación, llegando a un 15,15%.

Los porcentajes de infección no solo variaron a lo largo del estudio, después de cada alimentación, sino que además, variaron de acuerdo al estadio ninfal en el que se encontraba el insecto. En todos los grupos, se observó que el porcentaje de infección con *T. cruzi* disminuye al finalizar el estudio (Tabla Nro. 1).

Tabla Nro. 1: Número total de muestras (M) y muestras positivas (M+) a *T. cruzi* obtenidas de heces de *M. spinolai* después de cada alimentación (A).

Grupo	1° A		2° A		3° A *		4° A *		5° A	
	M	M+ (%)	M	M+ (%)	M	M+ (%)	M	M+ (%)	M	M+ (%)
1	17	0 (0)	17	0 (0)	7	0 (0)	3	0 (0)	2	0 (0)
2	30	5 (16,67)	29	0 (0)	24	4 (16,67)	11	2 (18,18)	9	1 (11,11)
3	36	22 (61,11)	36	3 (8,33)	22	17 (77,27)	12	7 (58,33)	12	4 (33,33)
4	33	8 (24,24)	31	0 (0)	30	1 (3,33)	12	2 (16,67)	10	0 (0)
5	42	11 (26,19)	41	11 (26,83)	17	6 (35,29)	-	-	-	-
Adultos	6	2 (33,33)	6	2 (33,33)	-	-	-	-	-	-
Total	164	48 (29,27)	160	16 (10)	100	30 (30)	38	11 (28,95)	33	5 (15,15)

* Alimentación posterior al periodo de ayuno.

Los grupos 2 y 4 registraron porcentajes de infección cercanos al 20%, mientras que en el grupo 1 no se detectaron muestras positivas a *T. cruzi*.

Los porcentajes de infección más elevados se encontraron en el grupo 3, que contenía inicialmente a las ninfas en estadio III pero que, luego de alimentarse en varias ocasiones, pasaron a ser IV, V e incluso algunas llegaron a la adultez. En este grupo, el 61% de los triatomíneos estaba infectado inicialmente. Luego, lo estuvieron el grupo 5 y el grupo de adultos, con porcentajes de infección cercanos al 30% (Tabla Nro. 1).

Al ser el grupo 3 el que presentó el porcentaje de infección más alto y las bandas amplificadas más fuertes, se utilizaron estas muestras para determinar los genotipos de *T. cruzi* circulantes en *M. spinolai* como una manera de caracterizar la infección. Los grupos restantes no pudieron ser genotipificados, ya que no se encontraron suficientes muestras positivas a *T. cruzi*.

En la figura Nro. 1 se observa el gel de transferencia correspondiente a la tercera alimentación y las membranas que hibridaron únicamente con los DTUs TcI y TcV.

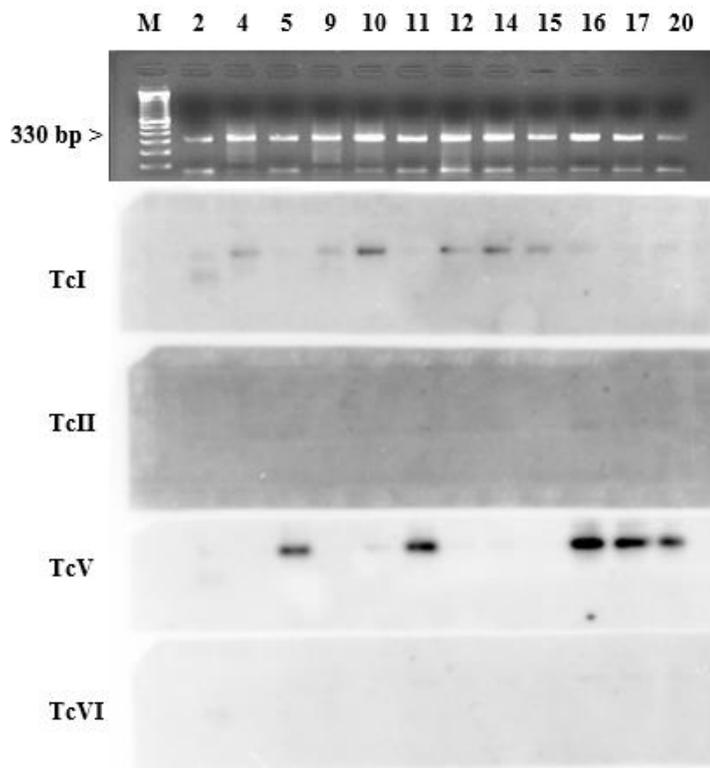


Figura Nro. 1: Genotipificación de *T. cruzi* en *M. spinolai*.

De los 22 triatominos positivos en el grupo 3, solo se lograron genotipificar 16. Los seis restantes no pudieron ser genotipificados, ya que presentaron bandas amplificadas muy débiles o no lograron sobrevivir al primer periodo de ayuno.

Durante el segundo periodo de ayuno murieron 6 triatominos, por lo que luego de la cuarta y quinta alimentación solo fue posible genotipificar 10 muestras.

Las hibridaciones realizadas muestran que los genotipos encontrados en los triatominos varían entre una alimentación y otra. Cabe destacar que, luego de algunas alimentaciones, los resultados de PCR fueron negativos en repetidas ocasiones y, por ende, no se pudieron genotipificar. En otros casos, siendo muestras positivas a PCR, no lograron hibridar con las sondas específicas que se utilizaron (Tabla Nro. 2).

Tabla Nro. 2: Variaciones de DTUs presentes en *M. spinolai*.

	1°A	2°A	3°A *	4°A *	5°A
2	+	-	TcI	-	-
4	TcI	-	TcI	/	/
5	+	-	TcV	-	-
6	-	-	-	TcII	-
9	TcI – TcV	-	TcI	TcII - TcV	TcI – TcII – TcV
10	+	-	TcI	/	/
11	+	-	TcV	/	/
12	TcI	TcV	TcI	/	/
13	TcI	-	+	TcII	-
14	+	TcV	TcI	/	/
15	TcI – TcV	TcV	TcI	+	TcI
16	TcV	-	TcV	-	-
17	+	-	TcV	TcII	+
18	+	-	+	TcV	-
19	+	-	-	TcII - TcV	+
20	-	-	TcV	/	/

* (-) Negativos a PCR. (+) Positivos a PCR que no hibridaron. (/) Vinchucas muertas.

Muestras obtenidas luego de la primera alimentación, hibridaron con los DTUs TcI y TcV, encontrándose infecciones únicas en cuatro triatomino y una combinación de ambos genotipos en dos ejemplares. Tres muestras de la segunda alimentación hibridaron solo con TcV y luego de la tercera alimentación, nuevamente se encuentran infecciones únicas con los DTUs TcI y TcV en siete y cuatro muestras, respectivamente.

El DTU TcI no es posible encontrarlo en muestras de la cuarta alimentación, sin embargo, vuelve a ser detectado en la última alimentación, en una vinchuca única con infección mixta, que contiene además los DTUs TcII y TcV.

Por otro lado, el DTU TcII es posible encontrarlo como genotipo único o asociado a TcV, en cinco muestras de la cuarta alimentación y en solo una muestra de la quinta alimentación. En ningún caso fue posible detectar el genotipo TcVI (Tabla Nro. 3).

Tabla Nro. 3: Frecuencia de DTUs presentes en *M. spinolai*.

	1°A	2°A	3°A *	4°A *	5°A
TcI	5	0	7	0	2
TcII	0	0	0	5	1
TcV	3	3	4	3	1
TcVI	0	0	0	0	0

El linaje encontrado con mayor frecuencia corresponde a TcV, tanto en infecciones únicas como mixtas. De los 16 triatomino que se lograron genotipificar, 11 hibridaron con esta sonda específica en una o más alimentaciones, lo que equivale a un 68,75% de las infecciones. Seguido del DTU TcI con un 50% y finalmente TcII, genotipo encontrado solo en cinco muestras, lo que equivale al 31,25% de las hibridaciones (Tabla Nro. 4).

Tabla Nro. 4: Porcentajes de *M. spinolai* infectados con cada DTUs.

DTU	%
TcI	50
TcII	31,25
TcV	68,75
TcVI	0

En cuanto a la composición genotípica, se observó una proporción considerable de infecciones mixtas (19%). Dentro de ellas, se logró identificar infecciones dobles por TcI-TcV y TcII-TcV e incluso una infección triple por TcI-TcII-TcV. Se encontró, por lo tanto, el linaje TcV en el 100% de ellas. En el 25% de los casos, el DTU encontrado, variaba de una alimentación a otra, entre los tres genotipos mencionados.

Por último, se observó una cantidad considerable de infecciones únicas (56%), en donde el DTU predominante fue nuevamente TcV con un 31%, seguido por los linajes TcI (19%) y TcII (6%) respectivamente (Figura Nro. 2).

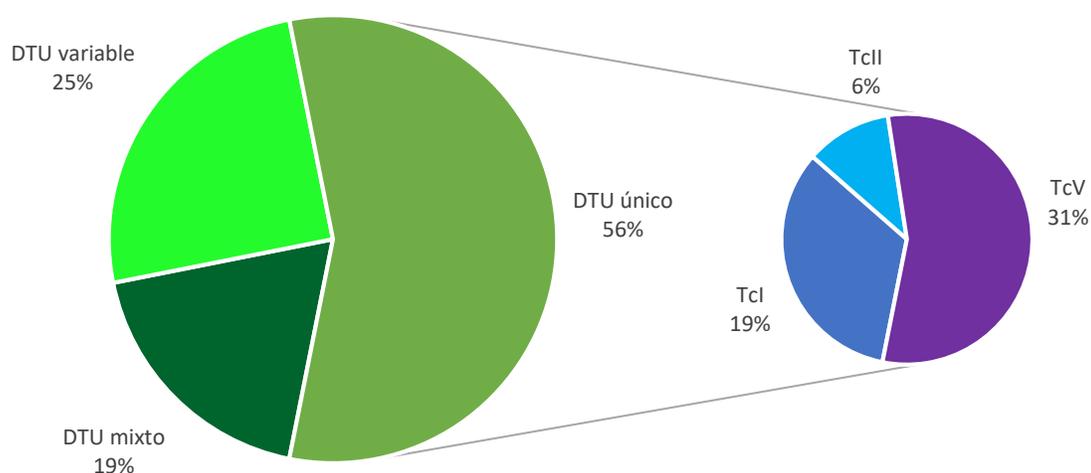


Figura Nro. 2: Genotipos circulantes de *T. cruzi* en *M. spinolai*.

Los triatomíneos que no pudieron ser genotipificados, se mantuvieron en la cámara incubadora, bajo condiciones de laboratorio adecuadas, descritas anteriormente. Se consignó la fecha de muerte de cada ejemplar para estudiar la sobrevivencia de cada grupo.

De los 176 ejemplares de *M. spinolai* recolectados, cerca del 7% de los triatomíneos murió antes de ser alimentados por primera vez. Esto debido al estrés que conlleva sacarlos de su hábitat, transportarlos durante varias horas desde la IV región hasta el laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, ubicado en la región Metropolitana y mantenerlos un par de días, a la espera de ser alimentados.

Durante los 40 días entre la primera y segunda alimentación se consignó una mortalidad cercana a un 2,5%, que fue similar a la ocurrida entre la cuarta y quinta alimentación. La mortalidad en ambos periodos de ayuno fue cercana al 35%. Por último, al momento de realizar la quinta y última alimentación, la sobrevivencia de *M. spinolai* alcanzó un 18,75%.

Los ejemplares que presentaron mayor resistencia al ayuno y que alcanzaron porcentajes de sobrevivencia significativamente más altos, fueron los que pertenecían a los grupos 2, 3 y 4, con porcentajes cercanos al 30% (Mantel-Cox = 40.88, $p < 0.0001$).

Los ejemplares del grupo 5 y adultos fueron los que presentaron una menor resistencia al ayuno. Ninguna vinchuca adulta sobrevivió al primer ayuno y ninguna vinchuca del grupo 5 resistió el segundo periodo (Figura Nro. 3).

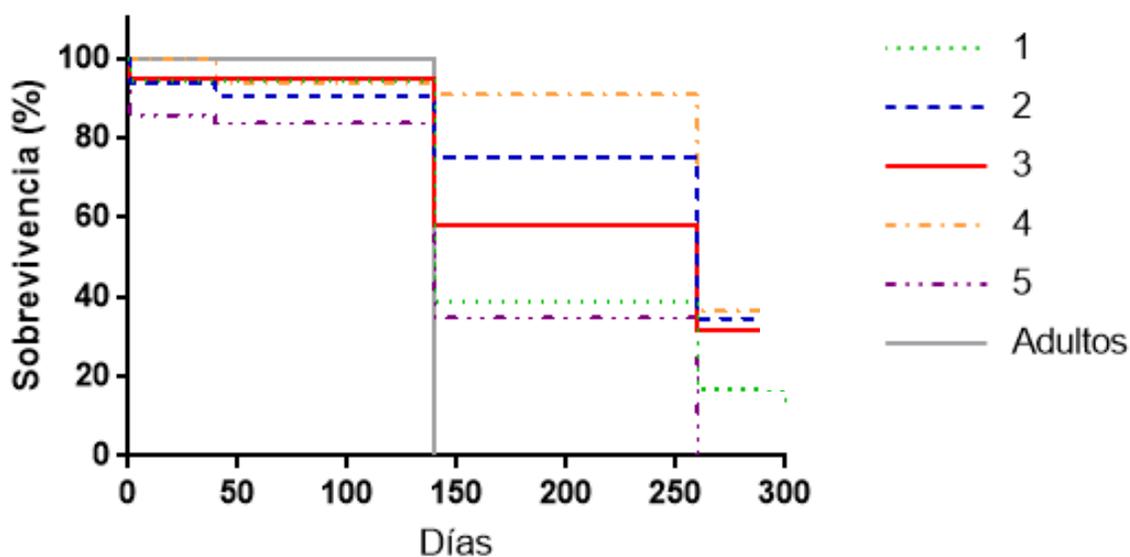


Figura Nro. 3: Porcentajes de sobrevivencia de *M. spinolai* según estadio ninfal durante todo el experimento.

Posterior a la quinta y última alimentación, se mantuvo a los insectos en condiciones de laboratorio adecuadas, descritas anteriormente, y se consignó la fecha de muerte de cada triatomino.

Algunas vinchucas lograron sobrevivir solo un par de meses, mientras que el triatominos más resistente, perteneciente inicialmente al grupo 3, sobrevivió los dos periodos de ayuno a los cuales fue sometido y, además sobrevivió un periodo de inanición posterior a la última alimentación que alcanzó los once meses (Tabla Nro. 5).

Tabla Nro. 5: Supervivencia de *M. spinolai* posterior a la quinta y última alimentación.

5° A (%)	50 días (%)	100 días (%)	150 días (%)	200 días (%)	250 días (%)	300 días (%)	350 días (%)
33 (18,75)	29 (16,48)	22 (12,5)	15 (8,52)	8 (4,55)	3 (1,7)	1 (0,57)	0 (0)

Luego de haber detectado infección por *T. cruzi* en ejemplares silvestres de *M. spinolai* y de haber estudiado la supervivencia de cada grupo, se comparó la supervivencia en individuos infectados y no infectados. Cabe destacar que 12 triatominos murieron antes de realizar la primera alimentación, de los cuales no se pudo obtener muestras de heces para su posterior análisis (Tabla Nro. 6).

Tabla Nro. 6: Número total de triatominos *M. spinolai* vivos y muertos al momento de realizar cada alimentación (A).

	1° A Total	2° A		3° A*			4° A*			5° A		
		Vivos	Muertos (+) (-)									
1	17	17	0 0	7	0 10	3	0 4	2	0 1			
2	30	29	0 1	24	0 5	11	2 11	9	0 2			
3	36	36	0 0	22	3 11	12	8 2	12	0 0			
4	33	31	1 1	30	0 1	12	3 15	10	1 1			
5	42	41	0 1	17	5 19	0	6 11	-	- -			
Ad	6	6	0 0	0	4 2	-	- -	-	- -			
Total	164	160	4	100	60	38	62	33	5			

* Alimentación posterior al periodo de ayuno.

La figura Nro. 4 muestra los porcentajes de sobrevivencia de triatomíneos infectados y no infectados. Datos de los grupos 1 y adultos no son mostrados por ausencia de infección y mortalidad temprana respectivamente. El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre insectos infectados y no infectados (Wilcoxon grupo 2 = 2.2, $p = 0,1374$; Wilcoxon grupo 4 = 0.27, $p = 0,6054$; Wilcoxon grupo 5 = 1.32, $p = 0,2503$), a excepción del grupo 3, donde los triatomíneos no infectados tienen una menor sobrevivencia significativa (Wilcoxon = 15.08, $p = 0.0001$).

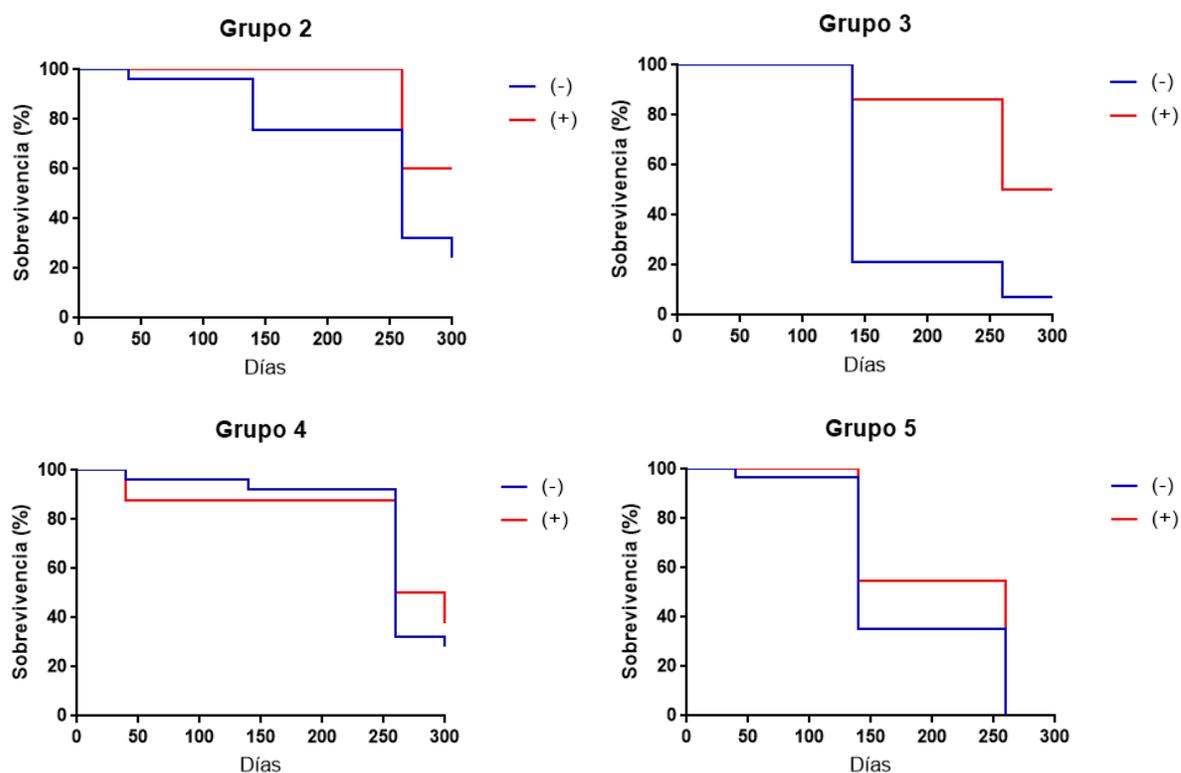


Figura Nro. 4: Porcentajes de sobrevivencia de *M. spinolai* infectados y no infectados.

DISCUSIÓN

En esta Memoria de Título se estudiaron las consecuencias del ayuno en la infección natural del vector *M. spinolai* con distintos genotipos de *T. cruzi* y el efecto en su sobrevivencia en condiciones de laboratorio, dado que estudios previos demostraron que triatomíneos infectados experimentalmente disminuyen el porcentaje de infección y sobrevivencia en ayuno prolongado.

En primer lugar, el objetivo fue detectar *T. cruzi* en las heces de *M. spinolai* posterior a cada alimentación. En informes previos con triatomíneos infectados experimentalmente en ayuno prolongado (Kollien y Schaub, 1997; Kollien y Schaub, 1998; Schaub y Boker, 1986) y en triatomíneos infectados naturalmente con régimen de alimentación continua (Egaña *et al.*, 2016) se ha descrito que el porcentaje de infección disminuye, debido a que los insectos son capaces de eliminar los parásitos de su intestino medio poco después de alimentarse, por lo tanto, es necesaria la reinfección para mantener o incrementar el porcentaje de infección y la transmisión del parásito.

El estudio realizado en esta Memoria de Título, utilizando muestras de heces de ejemplares *M. spinolai* naturalmente infectados, analizadas mediante la técnica de PCR, mostraron que, en la primera alimentación, el porcentaje de infección fue cercano al 30% y que luego de dos períodos de ayuno consecutivos con una alimentación intermedia y dos alimentaciones finales, el porcentaje de infección disminuyó a un 10%, lo que permitió confirmar estos estudios previamente citados.

Se ha demostrado que, durante periodos largos de ayuno, el 99,5% de los parásitos en el recto de los triatomíneos pueden morir, sometiendo a las poblaciones de *T. cruzi* a constante selección de linajes (Kollien y Schaub, 2000). *Mepraia spinolai* presenta una mayor tasa de infección por *T. cruzi* en comparación a otras especies de triatomíneos, lo cual se traduce en una mayor proporción de los diferentes linajes y mayor presentación de infecciones mixtas (Campos *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2013). Además, existen diferentes especies de hospederos, que podrían proporcionar diferentes linajes de *T. cruzi*, debido a la afinidad que existe entre algunos linajes y especies hospederas (Kollien y Schaub, 2000; Toledo *et al.*, 2013). En Chile, se ha detectado una mayor proporción de infección con el linaje TcV en animales peridomésticos (Rozas *et al.*, 2007).

En esta Memoria de Título, con el objetivo de determinar los genotipos circulantes de *T. cruzi* en *M. spinolai* silvestre, se realizaron hibridaciones al grupo 3, debido al alto porcentaje de infección que presentó este grupo. Si bien, no fue posible detectar hibridación con el genotipo TcVI, se detectaron los DTUs TcI, TcII y TcV en infecciones únicas y mixtas, destacando la presencia del linaje TcV en todas las combinaciones. El linaje encontrado con mayor frecuencia corresponde a TcV (68,75%), seguido de los DTU TcI (50%) y TcII (31,25%). Esto concuerda con estudios previos, en donde se ha encontrado que los linajes TcI y TcV abundan en poblaciones de *M. spinolai* en Chile (Campos *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2009).

En humanos, los DTU TcII, TcV y TcVI se encuentran asociados a la presentación de síndromes digestivos crónicos. Mientras que el DTU TcI, está asociado a cardiomiopatías severas y meningoencefalopatías en caso de presentar SIDA concomitantemente. Además, este último linaje, posee una mayor resistencia a drogas (Zingales *et al.*, 2012). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio podrían suponer un mayor riesgo de infección con el linaje TcV a través de *M. spinolai* silvestre y, por ende, una mayor probabilidad de desarrollar un megasíndrome.

Respecto a la sobrevivencia que presentó *M. spinolai* en este estudio, los grupos que mostraron mayor resistencia a los periodos de ayuno fueron los grupos 2, 3 y 4, mientras que, los triatomos que presentaron mayor mortalidad, fueron los grupos 1, 5 y adultos. En este estudio, ningún individuo del grupo 5 logró sobrevivir al segundo periodo de ayuno y ningún adulto sobrevivió al primero. Esta tendencia es similar a la encontrada en un estudio de Schaub y Löscher (1989) en donde se señala que los triatomos resisten al ayuno de manera distinta según su etapa de desarrollo. Las ninfas en estadio III, serían las de elección para realizar experimentos a largo plazo, ya que como se pudo observar en esta Memoria de Título, presentaron mayor resistencia a los periodos de ayuno y además, una alta tasa de infección.

Si bien se esperaba encontrar una mortalidad mayor en ninfas infectadas, respecto a las ninfas no infectadas como se ha descrito anteriormente (Botto-Mahan, 2009), al analizar la relación existente entre la positividad a *T. cruzi* de *M. spinolai* y su sobrevivencia, se encontró que en general, no existían diferencias significativas, salvo en el grupo 3, en donde se obtuvo una mortalidad significativamente mayor en ninfas no infectadas.

Esto podría deberse a que los triatominos llegaron al laboratorio con baja carga parasitaria, ya que se encontraban en condiciones de hambruna evidente, dificultando la detección de DNA mediante PCR, pudiendo generar resultados falsos negativos en los grupos 2, 4 y 5. Las escasas muestras positivas que se detectaron luego de varias repeticiones mostraron bandas de 330 pb marcadas débilmente, en comparación al control positivo.

En un estudio de detección de *T. cruzi* en tejido y sangre murina mediante PCR convencional y en tiempo real (qPCR), los resultados mostraron que, si bien ambas técnicas son eficaces para la detección de DNA, qPCR fue capaz de detectar menores cargas parasitarias que la PCR convencional (mayor sensibilidad de la técnica). La qPCR tiene 1,4 veces más probabilidad de detectar DNA de *T. cruzi* en músculo esquelético que la PCR convencional, mientras que en sangre esa probabilidad es 3,4 veces mayor (Davies *et al.*, 2014).

Debido a que la tendencia sería similar en muestras de heces, se decide amplificar con la técnica de qPCR dos muestras de distintos triatominos, de heces posteriores a la segunda alimentación. Ambas muestras se habían analizado anteriormente con la técnica de PCR convencional, siendo una levemente positiva y la otra negativa. Esta última muestra, se amplificó en, al menos 10 ocasiones, ya que, las muestras del mismo triatomo, luego de la primera alimentación, habían resultado positivas a *T. cruzi* en repetidas ocasiones. Los resultados del análisis de qPCR demostraron que ambas muestras estaban positivas, solo que la muestra negativa al PCR convencional presentaba una carga parasitaria bastante más baja que la otra muestra, casi al límite de la capacidad de detección de la qPCR. Por lo tanto, es probable que muchas vinchucas que murieron entre la primera y segunda alimentación hayan estado infectadas con una carga parasitaria inferior a la que puede detectar la técnica de PCR convencional y, por lo tanto, no pudieron ser detectadas.

Otra forma de explicar la mayor sobrevivencia de ninfas infectadas en el grupo 3, sería que, los triatominos infectados se encontraban más hambreados, lo que podría haber generado que consumieran un mayor volumen de sangre (lo cual no fue medido en este estudio). Estudios previos han demostrado que *T. cruzi* y *M. spinolai* compiten por los nutrientes, lo que hace que insectos infectados tengan hambre más temprano que triatominos no infectados, compensándose por un aumento en el número de eventos de alimentación y/o el volumen de sangre ingerido (Botto-Mahan *et al.*, 2006; Schaub, 1992; Schaub, 1994).

Si bien la infección no afectó la sobrevivencia de los triatomíneos, puede afectar otros aspectos del desarrollo de los insectos. En esta Memoria de título algunas vinchucas requirieron de tres alimentaciones para poder mudar. Incluso, ocurrió un caso aislado en el grupo 4, donde un triatomíneo, pese a alimentarse en cuatro ocasiones, murió sin haber mudado. Al analizar los resultados de PCR, se llegó a la conclusión de que el insecto que nunca mudó se encontraba infectado, por lo que, una vez terminado este estudio, se recopiló los datos de mudas de cada triatomíneo, para determinar si la infección por *T. cruzi* en *M. spinolai* silvestre, es capaz de alterar el desarrollo del insecto. La comparación de las vinchucas que mudaron entre las dos primeras alimentaciones reveló que, durante este período de 40 días, el desarrollo se retrasó en el grupo de ninfas infectadas, en comparación con el grupo de ninfas no infectadas (datos no mostrados).

Este estudio a largo plazo, con periodos de alimentación y ayuno en ninfas infectadas naturalmente, es más realista que otros estudios similares, para evaluar las interacciones vector-parásito, ya que la mayoría se realizan con ninfas criadas, alimentadas e infectadas experimentalmente bajo óptimas condiciones.

Los resultados obtenidos en la presente Memoria de Título sobre la patogenicidad, medida por la tasa de sobrevivencia/mortalidad en *M. spinolai* infectados y no infectados con *T. cruzi* son relevantes para explicar la transmisión del parásito en una dieta de alimentación más cercana a la que están expuestos los triatomíneos en la naturaleza, en donde al verse afectada la disponibilidad de alimento para los triatomíneos, se afecta también su estado nutricional y la carga parasitaria que poseen, lo cual podría resultar en el predominio de uno u otro linaje.

CONCLUSIONES

- Los porcentajes de infección por *T. cruzi* son más elevados en ninfas de *M. spinolai* en estadio III (61%). El porcentaje tiende a variar con las primeras alimentaciones y disminuye considerablemente después de los dos períodos de ayuno (33%). Estos resultados sugieren que la reinfección sería necesaria para incrementar la tasa de infección y la transmisión del parásito.
- En este estudio, se encontraron infecciones únicas y mixtas con los genotipos TcI, TcII y TcV, siendo este último, el linaje más abundante.
- La sobrevivencia de *M. spinolai* disminuyó levemente (2%), cuando las alimentaciones estaban separadas por 40 días y cayó aproximadamente en un 50% cuando fueron sometidos a periodos prolongados de ayunos.
- En *M. spinolai* se evidencia resistencia al ayuno, si bien existe una alta mortalidad cuando son privados de alimento, algunos triatomíneos son capaces de soportar cerca de 1 año de inanición en condiciones de laboratorio. Esta resistencia varía en cada estadio ninfal, siendo las ninfas III las más resistentes.
- En esta Memoria de título, la sobrevivencia de ninfas *M. spinolai* no parece verse afectada cuando se encuentran infectadas con *T. cruzi*.

BIBLIOGRAFÍA

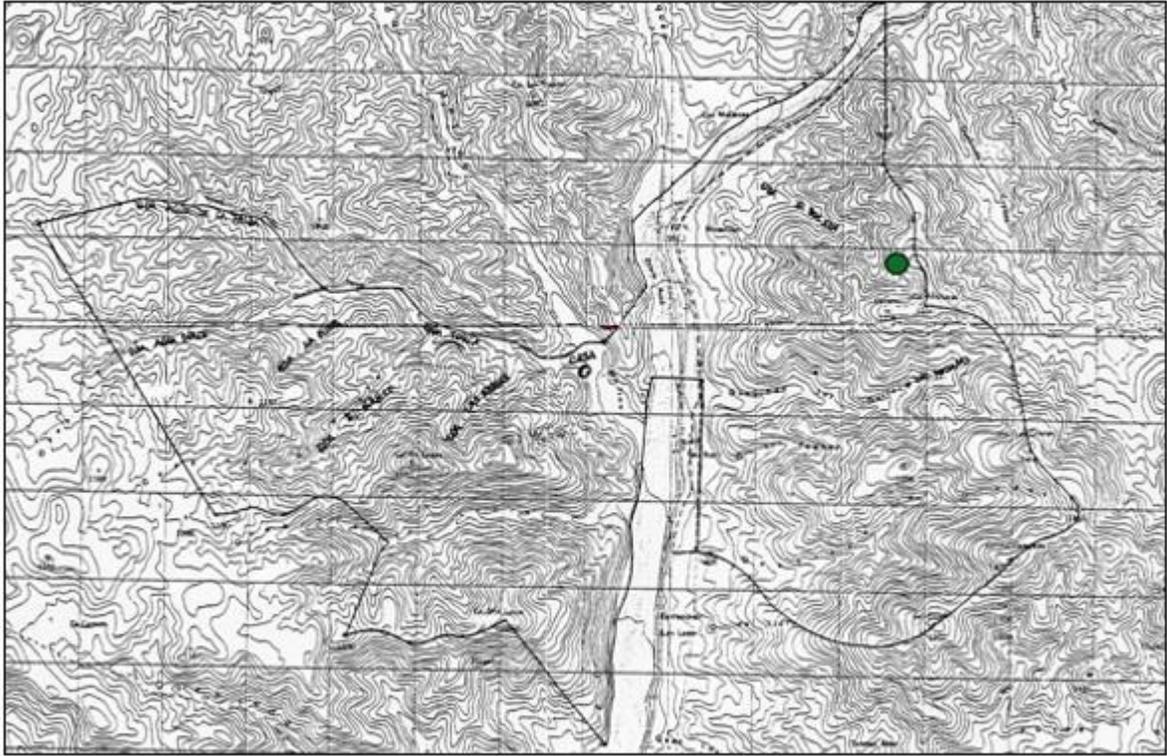
- ALZAMORA, A.; CORREA, P.; GAGGERO, E.; ACUÑA-RETAMAR, M.; CATTÁN, P.** 2007. Conducta de picada y defecación de *Mepraia spinolai* en dos hospederos frecuentes en su hábitat. *Parasitol. latinoam.* 62(3-4):112-117.
- APT, W.; HEITMANN, I.; JERECIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÓN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I: Introducción y epidemiología. *Rev. Chil. Infect.* 25(3):190-193.
- ARENAS, M.; CAMPOS, R.; CORONADO, X.; ORTÍZ, 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.
- AVILA, H.; SIMPSON, L.** 1995. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *RNA.* 1(9): 939-947.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTÁN, P.; CANALS, M.; ACUÑA, M.** 2005a. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia spinolai* in wild environment. *Acta Trop.* 95(2):160-163.
- BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; ROZAS, M.; CATTÁN, P.; SOLARI, A.** 2005b. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100(3):237-239.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.; MEDEL, R.** 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop.* 98(3):219-223.
- BOTTO-MAHAN, C.; SEPULVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUÑA-RETAMAR, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Trop.* 105(2):166-169.
- BOTTO-MAHAN, C.** 2009. *Trypanosoma cruzi* induces Life-History trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: Implications for parasite transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(5):505-510.
- CAMPOS, R.; ACUÑA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTÁN, P.; SOLARI, A.** 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop.* 104(1):25-29.
- CANALS, M.; EHRENELD, M.; SOLÍS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTÁN, P.** 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol. Día.* 22(3-4):72-78.

- CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTÁN, P.; SOLARI, A.** 2009. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmission cycle: the evaluation in the sylvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(4):656-659.
- COURA, J.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(1):113-122.
- DAVIES, C.; POMA, R.; MARINO, R.; MORA, M.; RAMOS, F.; RAJAL, V.; BASOMBRÍO, M.** 2014. Detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 48(4):421-428.
- EGAÑA, C.; PINTO, R.; VERGARA, F.; ORTIZ, S.; CAMPOS, R.; SOLARI, A.** 2016. Fluctuations in *Trypanosoma cruzi* infected: *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* after laboratory feeding. *Acta Trop.* 160:9-14.
- FELLET, M.; LORENZO, M.; ELLIOT, S.; CARRASCO, D.; GUARNERI, A.** 2014. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One.* 9(8): e105255.
- FRÍAS-LASSERRE, D.** 2010. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías *et al* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotrop. Entomol.* 39(4):572-583.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G.** 1997. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. *Parasitol. Res.* 83(8):781-788.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G.** 1998. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: Effects of blood ingestion by the starved vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(1):166-170.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G.** 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today.* 16(9):381-387.
- MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.** 2016. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34(2):132-138.
- MUÑOZ, C.; SOLARI, A.; APT, W.; ZULANTAY I.** 2013. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Ibero-Latinoam. Parasitol.* 72(1):5-21
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.** 2004. Evaluación Programa de Chagas Chile 2003. In: XIII Reunión de la Comisión Intergubernamental para Eliminación de *T. infestans* e Interrupción de la Tripanosomiasis Americana por Transfusión. Buenos Aires, Argentina. 29-31 marzo 2004. OPS. pp. 77-78.

- ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Wild and Periodomestic Mammals in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(4):647-653.
- SCHAUB, G.; BÖKER, C.** 1986. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Trop.* 43(4):349-354.
- SCHAUB, G.; LÖSCH, P.** 1989. Parasite/host inter-relationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 83(3):215-223.
- SCHAUB, G.** 1992. The effects of trypanosomatids on insects. *Adv. Parasitol.* 31:255-319.
- SCHAUB, G.** 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol. Today.* 10:463-468.
- SCHOFIELD, C.; GALVÃO, C.** 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110(2-3):88-100.
- TOLEDO, A.; VERGARA, F.; CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CORONADO, X.; SOLARI, A.** 2013. Short Report: *Trypanosoma cruzi* Genotypes in *Mepraia gajardoi* from Wild Ecotopes in Northern Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88(2):285-288.
- WESTENBERGER, S.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.; STURM, N.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 171(2):527-543.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S.; BRIONES, M.; CAMPBELL, D.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.; MACHADO, C.; MILES, M.; ROMANHA, A.; STURM, N.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.** 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(7):1051-1054.
- ZINGALES, B.; MILES, M.; CAMPBELL, D.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.; TEIXEIRA, M.; SCHIJMAN, A.; LLEWELLYN, M.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.; ANDRADE, S.; STURM, N.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12(2):240-253.

ANEXOS

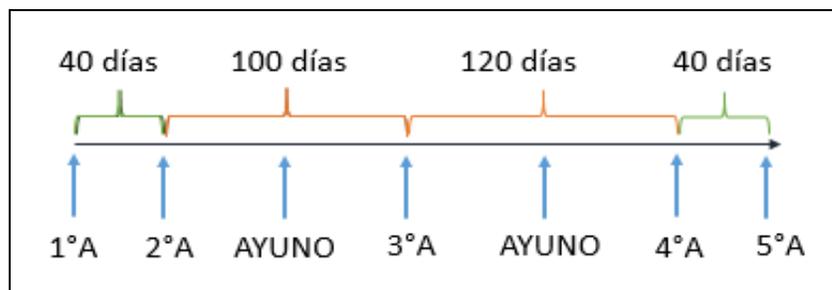
Anexo Nro. 1: Mapa de la Reserva Nacional Las Chinchillas. Se destaca en verde la zona de recolección de *M. spinolai*. (Cortesía de Dra. Botto-Mahan).



Anexo Nro. 2: Imágenes de la zona de recolección (Cortesía de Dra. Botto-Mahan).



Anexo Nro. 3: Esquema de estudio con cinco alimentaciones y dos periodos de ayuno.



Anexo Nro. 4: Certificación de bioética.



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES**

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: “*Prospective study of Octodon degus and Mepraia spinolai naturally infected with Trypanosoma cruzi*” cuyo investigador responsable es el **Dr. Aldo Solari** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0443 FMUCH).

El Dr. Solari se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2012.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 16 de Agosto de 2011.

Anexo Nro. 5: Certificación de bioseguridad.



**UNIDAD DE PREVENCIÓN DE RIESGOS & BIOSEGURIDAD
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

Santiago, June 08th 2011.-

To:
**FONDECYT PROGRAM
PRESENT**

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator, Dr. Aldo Geronimo Solari Illescas, the project proposal titled as "**Prospective study of Octodon degus and Mepraia spinolai naturally infected with Trypanosoma cruzi**". Molecular Biology of Parasites laboratory, Program of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biomedical Sciences (ICBM), Faculty of Medicine, University of Chile, which satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1st edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2nd edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4^a and 5th edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

Responsible investigator, Dr. Aldo Geronimo Solari Illescas is committed to meet all biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit, Faculty of Medicine, University of Chile. Concomitantly he is responsibly for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project.

Receiving acknowledgement: Dr. Aldo Geronimo Solari Illescas

Professor **Monica Acuña Patzke**
Risk Prevention and Biosafety Unit Director

* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

C.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute Director ICBM, Dr. Benjamín Suárez
- Responsible Investigator, Dr. Aldo Geronimo Solari Illescas.
- Archives

Av. Independencia 1027, Teléfono (56)-2 9786564, e-mail: biosegur@med.uchile.cl upr@med.uchile.cl