



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

**ESTUDIO LONGITUDINAL DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES  
EN *Mepraia gajardoi* NATURALMENTE INFECTADOS EN AYUNO Y  
REALIMENTADOS**

**RAQUEL CRISTINA PINTO SIERRALTA**

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

**PROFESOR GUÍA: ALDO SOLARI ILLESCAS**  
Laboratorio Biología Molecular de Parásitos, Programa de Biología Celular y Molecular,  
Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT 1120122**

**SANTIAGO, CHILE**  
2017



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

**ESTUDIO LONGITUDINAL DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES  
EN *Mepraia gajardoi* NATURALMENTE INFECTADOS EN AYUNO Y  
REALIMENTADOS**

**RAQUEL CRISTINA PINTO SIERRALTA**

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

	Nota	Firma
PROFESOR GUÍA: ALDO SOLARI	.....	.....
PROFESOR: GALIA RAMIREZ	.....	.....
PROFESOR: PEDRO CATTAN	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2017

# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
La Enfermedad de Chagas .....	2
Características de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
Características y distribución de vectores triatominos en Chile.....	8
OBJETIVOS .....	10
OBJETIVO GENERAL .....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
Captura de insectos y toma de muestra .....	11
Detección de kDNA de <i>T. cruzi</i> por PCR.....	11
Determinación de la variación en la detección de <i>T. cruzi</i> luego de una alimentación .....	12
Genotipificación de <i>T. cruzi</i> mediante <i>Southern blot</i> .....	12
Transferencia del DNA a membranas por difusión simple .....	12
Preparación de la sonda.....	13
Marcación radioactiva de la sonda .....	13
Hibridación con la sonda radiactiva .....	14
Bioseguridad .....	14

Análisis de Datos .....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIÓN.....	29
REFERENCIAS.....	30
ANEXOS .....	35

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero agradecer profundamente al Dr. Aldo Solari por acogerme en este proyecto, por ser un pilar imperecedero en el desarrollo de éste, por ayudarme a sacarlo adelante y a buen puerto, por sus consejos y apoyo incondicional. También a su equipo, Prof. Sylvia Ortiz por enseñarme y mejorar las técnicas de laboratorio, a Don Nicanor por su constante cariño, preocupación y por estar siempre atento a las vicisitudes del proceso... también a Don José. A los “vecinos”, Dr. Oscar Cerda por su consideración, sus charlas y sus consejos, al Dr. Héctor Toledo por su cariño y preocupación y “a todos sus compañeros” por el constante ánimo que me brindaron. No puedo dejar de lado a la Dra. Gemma Rojo y a Antonella Bacigalupo, por compartir sus conocimientos y guiarme en la búsqueda de los propios. También al departamento de Bioestadística FAVET, especialmente a Pablo Dufflocq por aclarar todas mis dudas. A mis compañeros de escuela y a todos los amigos que han recorrido este proceso conmigo, les doy infinitas gracias, en especial a Makarena Henríquez, Pablo Jara y Fernanda Vergara: gracias por los momentos compartidos, los llantos, los abrazos y las risas, las jornadas maratónicas de estudio, y por sobre todo, por dejarme aprender de ustedes. Para finalizar, quiero agradecer a mi familia y a los que no están: sé que están profundamente orgullosos de mí. También a Alexis León... gracias por compartir tus días conmigo y enseñarme cada día lo simple que es la vida, lo bueno que es reír y por no permitir que me rinda, que me desmorone ni que deje de soñar y agradecer especialmente a mi madre, Gloria Sierralta, porque sin ella todo sería muy distinto. Gracias mamá por ser la luz de los días más radiantes y en los momentos más oscuros, eres la mejor.

*“Todo tiene su final, nada dura para siempre”*  
Hector Lavoe

Dedicado a la Meme y al Pinto.

## RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es transmitida por *Trypanosoma cruzi*, protozoo hemoflagelado que posee un organelo denominado kinetoplasto, compuesto por kDNA, organizado en maxi y minicírculos. *T. cruzi* se divide en seis linajes evolutivos, conocidos como unidades discretas de tipificación (DTU's), denominadas TcI-TcVI. Este protozoo es transmitido por insectos vectores de la subfamilia *Triatominae*. En Chile, encontramos cuatro especies distintas de triatominos: *Triatoma infestans*, responsable del ciclo doméstico, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, responsables del ciclo silvestre y la recientemente descrita, *Mepraia parapatrica*. La situación de *T. infestans* ha sido controlada en zonas urbanas, lo que no ocurre con las especies del ciclo silvestre, las cuales se han hallado en el peridomicilio. Con el objetivo de detectar la presencia de *T. cruzi* mediante PCR, determinar los linajes circulantes en la especie utilizando *Southern blot* y establecer si realimentaciones continuas producen variación en el estado de infección de los insectos, se recolectaron 36 especímenes correspondientes a *M. gajardoi*, en la localidad de Caleta Vitor (Región de Arica y Parinacota). Para ello, se les mantuvo en un incubador que les proporcionó las condiciones óptimas de crecimiento y se les sometió a un régimen alimentario correspondiente a cinco alimentaciones con *Mus musculus* libres de *T. cruzi*, distanciadas entre ellas por 40 días. Inicialmente, 27 triatominos resultaron positivos (75%), detectando en ellos los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI, presentándose tanto infecciones simples como mixtas. Luego de una segunda alimentación, este porcentaje se mantuvo, para continuar con tendencia a la baja en la tercera, cuarta y quinta alimentación, con un 70%, 42% y 59%, respectivamente. Estos cambios no son explicados por realimentaciones continuas, sugiriendo que otras situaciones, como por ejemplo, una baja en la carga parasitaria, pudiesen afectar la tasa de infección a lo largo del tiempo. Los cuatro linajes inicialmente detectados se mantienen hasta la cuarta alimentación, en donde sólo se detecta TcII, para luego detectar sólo una infección mixta en la quinta alimentación, TcI-TcVI, indicando que los linajes de *T. cruzi* en *M. gajardoi* se presentan de forma variable en el tiempo.

## ABSTRACT

Chagas disease is transmitted by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan hemoflagellate that has an organelle named kinetoplast, composed of kDNA, organized in maxi and minicircles. *T. cruzi* can be divided into six evolutionary lineages, known as discrete typing units (DTU's), termed TcI-TcVI. This protozoan is transmitted through insect vectors of the subfamily *Triatominae*. In Chile, we found four different species of triatomines: *Triatoma infestans*, responsible for the domestic cycle, *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardoi*, responsible for the wild cycle and the recently described *Mepraia parapatrica*. The situation of *T. infestans* has been controlled in urban areas, but not the wild-cycle species, which have been found in the peridomicile. To detect the presence of *T. cruzi* by PCR, to determine the circulating lineages in the species using Southern blot and establish if continuous feedings produced variation in the infection state of the insects, thirty-six specimens corresponding to *M. gajardoi* were collected in Caleta Vitor, Arica and Parinacota Region. For this, they were kept in an incubator that provided the optimal conditions of growth. They were fed with five feeds of non-infected *Mus musculus*, distanced between them for 40 days. Initially, 27 triatomines were positive (75%), detecting TcI, TcII, TcV and TcVI lineages, presenting both simple and mixed infections. After a second feed, this percentage was maintained, to continue downward trend in the third, fourth and fifth feed, with 70%, 42% and 59%, respectively. Although these changes are not explained to continuous feedings, suggesting that other situations, such as a drop in parasite load, could affect the rate of infection over time. The four lineages initially detected were maintained until the fourth feeding, where only TcII was detected and then only a mixed infection, TcI-TcVI, was detected in the fifth feed, indicating that the *T. cruzi* lineages in *M. gajardoi* present variable changes over time.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis vectorial que existe en América hace más de 9.000 años (OMS, 2015). Es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*Trypanosomatida: Trypanosomatidae*), el cual se divide en seis linajes evolutivos conocidos como unidades discretas de tipificación (DTUs) denominadas TcI-TcVI (Zingales *et al.*, 2009) y un nuevo linaje asociado a murciélagos correspondiente a Tcbat (Marcili *et al.*, 2009). *Trypanosoma cruzi* posee un organelo llamado kinetoplasto, compuesto por una red de DNA encadenado, el DNA kinetoplastídico (kDNA), organizado en maxi y minicirculos. Este protozoo se encuentra en una amplia variedad de mamíferos silvestres, domésticos y sinantrópicos y se transmite a los seres humanos principalmente mediante las deyecciones de insectos vectores hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (*Hemiptera: Reduviidae*) (Apt *et al.*, 2008; OMS, 2015). En Chile, la enfermedad se extiende desde la Región de Arica y Parinacota a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins (Apt *et al.*, 2008), siendo su tasa de incidencia el año 2014 de 5,6 nuevos casos, cada 100.000 habitantes y el 27,15% de todos los casos notificados ese año se concentraron en las Regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta (MINSAL, 2015). Dentro de los triatominos presentes en el país encontramos a *Triatoma infestans* Klug, 1834, responsable de transmitir *T. cruzi* en el ciclo doméstico, a *Mepraia spinolai* Porter, 1934 y *Mepraia gajardoi* Frías, 1998, responsables del ciclo silvestre, y el recientemente descrito *Mepraia parapatrica*. *Mepraia gajardoi* habita en el litoral desértico entre las regiones de Arica y Parinacota y Antofagasta, precisamente entre los 18° y 26° S. Estudios en dicha zona han reportado resultados positivos a *T. cruzi* aislados en momias (Aufderheide *et al.*, 2004; Rothhammer *et al.*, 1985) y triatominos. El 2013, Toledo *et al.*, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reporta la detección de *T. cruzi* en *M. gajardoi* de sitios silvestres alejados y cercanos a emplazamientos humanos con resultados de 11% y 27%, respectivamente. Se encontraron en las muestras los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI mediante la genotipificación a través de pruebas de hibridación con sondas de DNA genotipo específicas. En el presente estudio, empleando las mismas técnicas se analizaron deyecciones de *M. gajardoi* capturados en condición de ayuno para establecer la presencia de *T. cruzi* y sus variaciones a través del tiempo, una vez que son realimentados periódicamente y determinar los linajes circulantes en la especie.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Se transmite principalmente mediante las deyecciones de insectos vectores hematófagos triatominos y se describen también las vías transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos infectados, accidentes en laboratorios y vía oral, esta última debido al consumo de alimentos contaminados con deyecciones de triatominos infectados (Toso *et al.*, 2011). La enfermedad de Chagas se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta la Región del Libertador Bernardo O'Higgins (Apt *et al.*, 2008) y se han reportado casos en Canadá, Europa y en zonas no endémicas de Estado Unidos, debido al aumento de migrantes americanos infectados a estas áreas. En humanos, esta enfermedad cursa hacia la cronicidad, pasando por tres etapas en personas inmunocompetentes: aguda, latente y crónica, afectando principalmente el corazón (miocarditis) y el sistema digestivo (megacolon y megaesófago), pudiendo causar la muerte en diferentes etapas de la infección (Apt *et al.*, 2008; Noireau *et al.*, 2009). Existen sólo dos fármacos con eficacia demostrada frente a la infección por *T. cruzi*: benznidazol y nifurtimox. No se han desarrollado vacunas exitosas, por lo que la vigilancia y la educación para prevenir casos debido al trasplante de órganos o transfusiones sanguíneas (OMS, 2015), junto con el control del vector domiciliario, encabezan actualmente la lista de medidas de prevención (Noireau *et al.*, 2009). En 1991, varios países sudamericanos (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) crearon la Iniciativa del Cono Sur para controlar y eliminar la enfermedad de Chagas (INCOSUR-Chagas). En el país se logró eliminar las colonias del vector domiciliario *Triatoma infestans* de los espacios domésticos (Lorca *et al.*, 2001), pero en la actualidad se han encontrado nuevos nichos de este vector en áreas silvestres en la zona central de Chile (Bacigalupo *et al.*, 2012).

La enfermedad es considerada dentro de un grupo de 17 enfermedades mundialmente conocidas como enfermedades tropicales desatendidas, las que están presentes desde los inicios de la humanidad y están íntimamente asociadas a los sectores más pobres de la población, gente marginada o que habita en zonas rurales o peri-urbanas. La mortalidad que producen no es tan importante como la discapacidad crónica, la morbilidad, los costos económicos por ausentismo laboral o por ausentismo infantil en las escuelas y el estigma generado en aquellos que las padecen. A pesar de ello, para muchos países no son un problema prioritario de salud pública (WHO, 2015).

Esta tripanosomiasis fue descrita por el Dr. Carlos Chagas, quién observó al protozoo *T. cruzi* en muestras de insectos hematófagos recolectados desde domicilios del norte de Minas Gerais. Éstos eran de hábitos nocturnos y durante el día se escondían en las grietas y recovecos de las casas construidas de material ligero. Sólo se reportaban ataques a humanos cuando las luces de los domicilios se apagaban. Así, se recolectaron y analizaron muestras de sangre periférica de niños que habían cursado con cuadros febriles y gangliomegalia local o generalizada y de gatos, encontrándose numerosas formas del protozoo (Chagas, 1909). En trabajos experimentales de laboratorio, se logró infectar con éxito macacos y cobayos, se analizaron muestras de distintas partes del tracto intestinal de los insectos triatominos, encontrándose múltiples formas del protozoo, demostrando que el parásito hacía su ciclo de vida en mamíferos y triatominos (Chagas, 1909). Rothhammer, a mediados de la década de los ochenta, publicó un trabajo en donde halló manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (megacolon y cardiomegalia) en 9 momias datadas entre 470 años A.C. y 600 años D.C. encontradas en la Quebrada de Tarapacá, siendo esta la primera evidencia de enfermedad de Chagas en periodos pre-colombinos (Rothhammer *et al.*, 1984). Posteriormente, se confirma la existencia de esta enfermedad mediante Nested-PCR en 143 de 283 momias humanas datadas en un periodo de 9000-9200 años atrás, en las costa del sur de Perú y en la región de Tarapacá (Aufderheide *et al.*, 2004), determinando la antigüedad de la enfermedad en el continente americano.

### **Características de *Trypanosoma cruzi***

Es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida*, diploide y de reproducción clonal (Tibayrenc *et al.*, 1986). Sin embargo, gracias a la secuenciación de diversos loci nucleares y mitocondriales se ha descrito que existen linajes de características híbridas generados por la capacidad de recombinar DNA de manera excepcional en poblaciones naturales, por lo que este intercambio genético es poco frecuente, manteniéndose estables los linajes de *T. cruzi* en el tiempo y espacio (Westenberger *et al.*, 2005). Todos los trypanosomas son parásitos y estudios filogenéticos indican que el género es monófilo, lo que sugiere que un parásito ancestral originó a los tripanosomas mamíferos de África, América y Australia (Schofield, 2000; Stevens *et al.*, 2001). Se sugiere que el protozoo es un organismo muy antiguo, desarrollándose antes de que los continentes se separaran, en la era mesozoica, hace 230 millones de años (ma). Se deduce que las primeras formas de *T. cruzi*, estaban asociadas a marsupiales de la familia *Didelphidae* (zarigüeyas) al momento de la separación de América del Sur de Gondwana, hace unos 40 ma, transmitiéndose entre la especie a través de secreciones por glándulas anales y/u orina. Hace 2,5 ma las zarigüeyas

eran común en toda América del Sur, junto con otros vertebrados: aves, armadillos, y diversas formas de roedores; los refugios disponibles probablemente eran compartidos entre ellos y también por insectos triatomínicos que se desarrollarían como hematófagos facultativos, capaces de alimentarse con sangre infectada con el tripanosoma primitivo, proporcionando el vehículo para difundir el parásito a nuevos huéspedes. El parásito no sobrevive en las aves, debido a una lisis mediada por el sistema del complemento presente en la sangre de éstas, pero en roedores, armadillos y murciélagos no sólo logra sobrevivir, sino que las profundas presiones de selección conducen al desarrollo de nuevos linajes, hoy distinguibles por una serie de marcadores genéticos (Schofield, 2000). Mediante el uso de estudios isoenzimáticos de patrones electroforéticos, las poblaciones de *T. cruzi* se pudieron dividir en tres grupos que fueron llamados zimodemos: Z1, Z2, y Z3 (Miles *et al.*, 1978). Otra clasificación, basada en estudios filogenéticos, distinguió a dos grandes linajes divergentes, llamados *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII). A su vez, el segundo linaje fue dividido en cinco grupos TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe. Z1 corresponde a TcI, mientras que Z2 y Z3 corresponden a TcIIb y TcIIa, respectivamente. Los sublinajes TcIIa, TcIIc, TcIId y TcIIe se consideraron híbridos generados por fenómenos de recombinación entre ellos (Westenberger *et al.*, 2005). La nueva clasificación ha dividido a *T. cruzi* en seis linajes evolutivos, conocidos como unidades discretas de tipificación (DTUs), denominadas TcI-TcVI (Zingales *et al.*, 2009), siendo TcI, TcII, TcV y TcVI los linajes encontrados frecuentemente en Chile (Solari *et al.*, 2001), y en un reciente estudio se reporta la circulación de TcIII en perros domésticos en las regiones de Coquimbo y Tarapacá (Ortiz *et al.*, 2016). En la actualidad se describe un nuevo linaje asociado preferentemente a murciélagos, denominado Tcbat (Marcili *et al.*, 2009). En la morfología celular de *T. cruzi*, encontramos todas las estructuras comunes para las células eucariontes, y un organelo peculiar llamado kinetoplasto, que lo agrupa dentro de los kinetoplastidos, grupo al que pertenecen los tripanosomas, leishmanias y critidias. Este organelo se encuentra en la porción basal de la célula formando un complejo con la mitocondria. El kinetoplasto está constituido por DNA kinetoplastídico encadenado (kDNA), organizado en maxicírculos y minicírculos (De Souza, 2009) y comprende el 15-30% del total de DNA (Teixeira *et al.*, 2011). Los minicírculos se componen por cuatro regiones conservadas intercaladas por regiones hipervariables, que codifican RNAs guías (gRNAs), los cuales modifican los transcritos de los maxicírculos en un proceso conocido como edición de RNA. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente como el DNA mitocondrial de eucariontes, ya que codifican a RNAs codificadores de proteínas, RNAs ribosomales y RNA de transferencia mitocondriales (Teixeira *et al.*, 2011).

Morfológicamente, *T. cruzi* puede presentar principalmente cuatro formas: amastigote, epimastigotes (formas replicativas), tripomastigote y tripomastigote-metacíclico (formas no replicativas) (Apt *et al.*, 2008). Las distintas formas de *T. cruzi* se desarrollan según el hospedero en el que se encuentre. Es así como en el tracto intestinal de insectos triatominos podemos encontrar, además de las tres principales formas de *T. cruzi* (epimastigote, tripomastigote y esferomastigote), una variedad de formas intermedias que pueden ser resumidas como: flagelados con una forma similar a una gota (intermediarios entre esferomastigotes y epimastigotes o tripomastigotes) o una forma delgada (intermediarios entre epimastigotes y tripomastigotes); la importancia biológica de las distintas formas que desarrolla *T. cruzi* es sólo conocida para epimastigotes y tripomastigotes (Kollien & Schaub, 1999).

### **Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo de *T. cruzi* comienza cuando un triatomino adquiere el parásito al ingerir sangre con las formas tripomastigotas del mamífero hospedero. En el ciclo silvestre, éste corresponde a un mamífero, y en el caso del ciclo doméstico, al humano u otro mamífero doméstico o sinantrópico. En el intestino delgado del insecto, dichas formas parasitarias se diferencian en epimastigotes y se multiplican. Luego, transitan hasta el intestino posterior del vector, donde los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos no replicativos, los cuales son excretados junto a las deyecciones, posterior a la hematofagia. Estos tripomastigotes metacíclicos ingresan por lesiones en la piel o por las mucosas de los mamíferos al torrente sanguíneo donde alcanzan otras células y las infectan. Dentro de éstas se transforman en amastigotes, se multiplican y diferencian en tripomastigotes. Luego, la célula hospedera es destruida y los tripomastigotes son liberados al torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos) pudiendo alcanzar nuevas células o ser ingeridos por un triatomino, iniciando nuevamente el ciclo (Orellana-Halkyer y Arriaza-Torres, 2010).

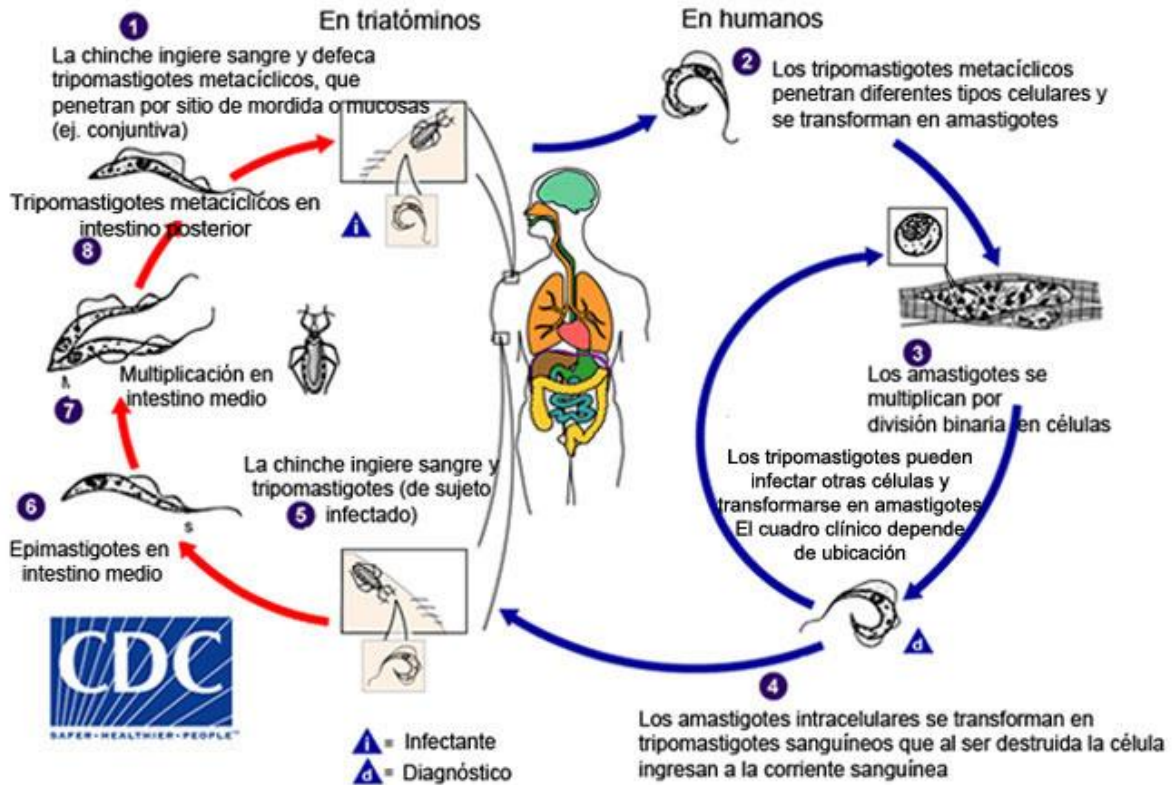


Figura 1. Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*. Centers for Disease Control (CDC)/Division of Parasitic Diseases and Malaria. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

El desarrollo de *T. cruzi* en el vector se ve afectado por varios factores, por ejemplo: el linaje de *T. cruzi*, la especie y el estadio del insecto, la dosis y la duración de la infección, y la temperatura (Kollien & Schaub, 1998). En el caso de triatóminos normalmente alimentados, las formas epimastigote y tripomastigotes son las colonizadoras mayoritarias del tracto intestinal, los tripomastigotes metacíclicos se desarrollan en el recto y son formas infectantes para mamíferos, los epimastigotes son, en contraste a los tripomastigotes, capaces de multiplicarse y colonizar todo el tracto intestinal del vector. Ambas formas son dominantes en una población establecida de *T. cruzi* en insectos regularmente alimentados, en donde la forma esferomastigote ocurre sólo en situaciones de ayuno. Su porcentaje aumenta en el recto de insectos en ayuno, como una adaptación del flagelado al stress sometido (Kollien & Schaub, 1998). Debido a la falta de nutrientes, la población de parásitos en el lumen del tracto digestivo del insecto desciende, con una disminución en el número de parásitos mayor en el intestino delgado que en el recto, y es posible encontrar flagelados muertos, principalmente en el lumen del recto. Los periodos de hambruna también modifican de

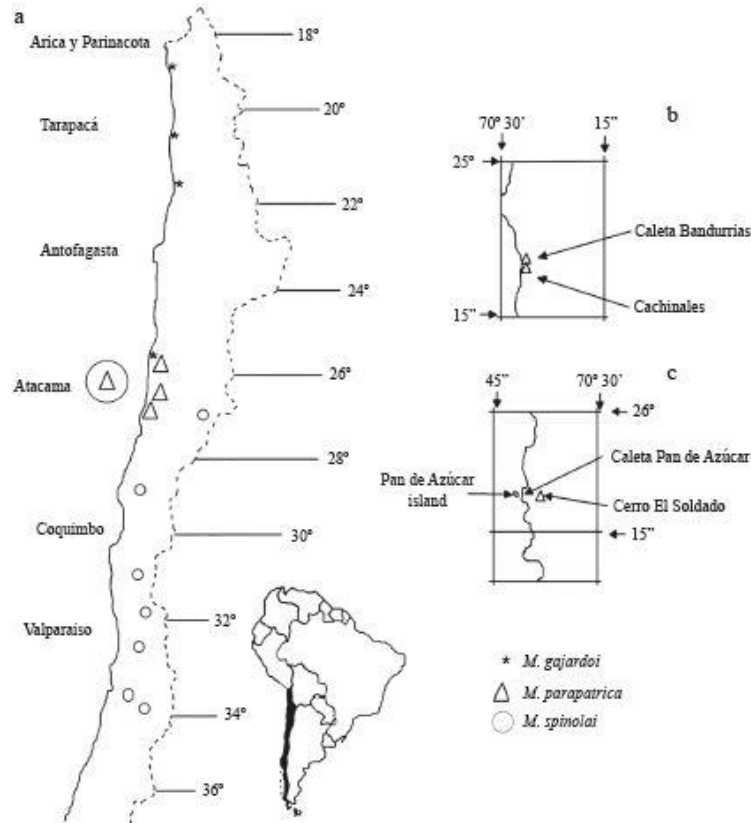
manera distinta las diferentes formas de *T. cruzi*, la cantidad de epimastigotes y tripomastigotes se reduce y aumentan los esferomastigotes y las formas intermedias. El aumento del periodo de ayuno causa la pérdida de *T. cruzi* en el intestino delgado y una fuerte reducción en el total de la población luego de 30 días después de la última alimentación. Los efectos del ayuno sobre la densidad de la población, no sólo son ocasionados debido a la reducción de la multiplicación de los flagelados, sino también por su muerte. Mientras que el número de metacicloporos por insecto se ve reducido (Kollien & Schaub, 1998), el porcentaje de tripomastigotes no se ve afectado por el ayuno. Los epimastigotes se ven reducidos en número y porcentaje, esto relacionado con un temprano aumento en el número de flagelados de formas intermedias, seguido por un aumento en el número y porcentaje de los esferomastigotes (Kollien & Schaub, 1999). En este escenario, si el triatomino vuelve a alimentarse los esferomastigotes se desarrollan a epimastigotes y el número de tripomastigotes aumenta (Kollien & Schaub, 2000). La hematofagia es seguida por la deyección, lo que afecta a la población total del recto, que se ve reducida a más de la mitad debido a que los flagelados son depositados junto a las heces y la orina (Schaub & Loesch, 1988; Schaub, 1989). En las deyecciones se encuentra un 30% de la población que antes se encontraba en el lumen rectal del insecto, siendo el porcentaje de tripomastigotes más alto en la orina que en las heces (Schaub, 1989). Un día después de ser alimentados los insectos, la población total rectal de *T. cruzi* no varía, las formas epimastigotas son las formas dominantes (73%-78%), las formas tripomastigotas disminuyen a menos del 10% y los esferomastigotes y formas intermedias alcanzan menos del 6%. Es posible observar otra forma que se conoce como células gigantes. Éstas poseen una gran masa citoplasmática, muchos núcleos, kinoplasto y no poseen flagelo (Kollien & Schaub, 1998). El desarrollo de estas células gigantes parece ser inducido por las condiciones de alimentación, ya sea después de la infección del vector o después de largos periodos de inanición (Kollien & Schaub, 1999). Al día siguiente de ser alimentados los insectos, la población parasitaria rectal se reduce y al tercer día vuelve a disminuir ligeramente. Entre el segundo y el tercer día luego de re-alimentarse, la proporción de las diferentes formas no cambia, a excepción de las formas intermedias. Entre cinco y diez días post alimentación la población de *T. cruzi* aumenta más de tres veces, lo que se explica principalmente por el aumento de flagelados anclados a la pared rectal. Las células gigantes disminuyen significativamente entre el tercer y el quinto días post-alimentación en el lumen y en la pared del recto hasta desaparecer a los diez días post re-alimentación (Kollien & Schaub, 1998). Es así como podemos resumir que el efecto del ayuno o de alimentar al insecto en *T. cruzi* se manifiesta en la actividad de los flagelados, la densidad y la composición poblacional (Kollien & Schaub, 1998). El ayuno o la inanición del vector induce al desarrollo de esferomastigotes y una alimentación subsiguiente induce un desarrollo adicional de epimastigotes y células gigantes. La

alimentación después de un corto periodo de ayuno induce metaciclogenesis en los epimastigotes y al aumento de la densidad poblacional, mayoritariamente de los tripomastigotes metacíclicos (Kollien & Schaub, 1999).

### **Características y distribución de vectores triatominos en Chile**

Como se mencionó anteriormente, los insectos vectores de la enfermedad de Chagas pertenecen al orden *Hemiptera*, subfamilia *Triatominae* (Orellana-Halkyer y Arriaza-Torres, 2010). Son hematófagos estrictos y oportunistas, pudiendo alimentarse de roedores, marsupiales, otros mamíferos, aves y humanos. En Chile, estos vectores corresponden a *T. infestans* Klug, 1834 (ciclo doméstico) encontrado entre las latitudes 18° y 34° S, *M. spinolai* Porter, 1934, cuya distribución abarca las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta, Atacama, Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana (Apt *et al.*, 2008) y *M. gajardoi* Frías, 1998, que se encuentra en las playas y desierto costero de las regiones de Arica y Parinacota y Tarapacá (Frías *et al.*, 1998). Estos dos últimos son responsables principalmente del ciclo silvestre, aunque *M. spinolai*, en ocasiones invade el hábitat doméstico y ha sido encontrado en el peridomicilio junto con *T. infestans*, colonizando nuevos nichos aportados por bromeliáceas en la comuna del Cajón del Maipo, Región Metropolitana (Bacigalupo *et al.*, 2012). Actualmente se describe una cuarta especie de triatomo, *M. parapatrica* (Frías-Lasserre, 2010), cuya distribución se confina a la Isla Pan de Azúcar y al litoral desértico de las regiones de Antofagasta y norte de Atacama (20°12'20''S, 70°26'07''O y 26°10'10''S, 70°40'03''O), cohabitando con *M. gajardoi* al norte y *M. spinolai* al sur. La morfología genital, tanto de hembras como machos de las tres especies, es diferente, lo que sugiere que no se reproducen entre ellas. En un estudio realizado por Sagua *et al.* (2000) no se detectó infección con *T. cruzi* desde *M. parapatrica* capturados en Isla Pan de Azúcar, en donde esta especie se alimenta preferentemente de aves marinas (78%), mamíferos marinos (14%) y lagartos (7%) según el análisis realizado en el mismo estudio, por lo que aún no se determina si esta nueva especie descrita transmite la enfermedad de Chagas. Por otro parte, se conoce que *M. spinolai* está infectado con *T. cruzi*. En la zona central de Chile se ha reportado entre un 46.2% y 61%, mientras que para *M. gajardoi*, Botto-Mahan *et al.* (2008) reportan 11,8% de positivos, Carvajal *et al.* (2007) reportan 19,2%, Toledo *et al.* (2013) reportan un 14%, encontrando en Caleta Vitor una tasa de infección de 12.6% y Egaña *et al.* (2014), realizaron un experimento con ejemplares de *M. gajardoi* en los que detectaron un 20% de infectados y luego de una alimentación artificial, este porcentaje aumentó a un 74.6%. Para *T. infestans*, el principal vector domiciliario, la población está controlada en zonas pobladas gracias al Programa Nacional de Control del Vector efectuadas por el gobierno de Chile e

impulsadas INCOSUR-Chagas (Lorca *et al.*, 2001), aunque Bacigalupo *et al.* (2012) en su trabajo, reportaron la colonización de áreas silvestres en la zona central de Chile por parte de *T. infestans*.



**Figura 2. Distribución geográfica de los vectores silvestres *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica* en las zonas Norte, Centro-Norte y Central de Chile (Frías-Lasserre, 2010).**

El actual ritmo de expansión de los emplazamientos humanos nos ha llevado a invadir nuevos ambientes, aumentando el avistamiento de fauna autóctona silvestre en zonas urbanas. Este planteamiento es válido también para los vectores silvestres de la enfermedad de Chagas, por lo cual es importante estudiar detalles de su conducta biológica y alimentaria, distribución geográfica y particularmente del estado de infección de estas especies. Esto es vital para entender el escenario actual en la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, y así plantear las nuevas estrategias de control en el país.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar presencia de linajes de *T. cruzi* en el vector silvestre *M. gajardoi* capturados desde zonas endémicas de Chile y sometidos a realimentación continua.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Detectar la presencia de *T. cruzi* en los ejemplares de *M. gajardoi* capturados en una de las zonas endémicas de Chile.
- 2.- Determinar variaciones de infección de *T. cruzi* luego de una alimentación continua de *M. gajardoi*.
- 3.- Determinar los linajes de *T. cruzi* en los ejemplares de *M. gajardoi* capturas y realimentados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de Parásitos pertenecientes al Programa de Biología Celular y Molecular ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **Captura de insectos y toma de muestra**

Los ejemplares fueron recolectados en las playas del norte grande, en el sector de Caleta Vítor en Diciembre de 2012. Estos fueron capturados manualmente (humanos como cebo). Para esto se esperó aproximadamente 10-15 minutos en un lugar que cumplía con las condiciones bióticas y abióticas para albergar a estos insectos; si durante este tiempo no se acercaba ninguno, el investigador cambiaba de lugar para repetir el procedimiento en otro sitio. Los ejemplares capturados fueron llevados al laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y se mantuvieron dentro de un incubador que les proporcionó las condiciones óptimas de crecimiento (27° C, 75% de humedad relativa y fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad). Los ejemplares capturados fueron alimentados con *Mus musculus* de laboratorio libres de *T. cruzi*, sedados con tiopental al 2%, aproximadamente tres días post captura. Inmediatamente después de la hematofagia, fueron puestos en cubículos individuales donde se identificaron con números y se esperó a que cada espécimen defecara espontáneamente, se recolectaron las muestras de sus deyecciones diluidas en 100 µl de agua para PCR y fueron almacenados a -4° C en tubos Eppendorf rotulados con el número del individuo y de toma de muestra hasta ser procesados.

Para el procesamiento de las muestras éstas se hirvieron por 15 minutos y se centrifugaron quedando listas para extraer los volúmenes de sobrenadantes que fueron depositados en el tubo con la mezcla de la reacción. Los especímenes se alimentaron nuevamente a los 40 días para tomar una segunda muestra de deyecciones, y así hasta completar cinco alimentaciones o hasta la muerte de los mismos.

### **Detección de kDNA de *T. cruzi* por PCR**

Las muestras obtenidas se analizaron mediante ensayo PCR para detectar al parásito a través de la amplificación de las regiones hipervariables de los minicírculos del kDNA de *T. cruzi*.

La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador Techne®TC-512. La mezcla de la reacción estaba constituida por 5 µl de la muestra, 3 µl de los oligonucleótidos 121(5'- AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'- GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3') a una concentración de 25 µM, 5 µl de buffer de Taq polimerasa (67mM de Tris-HCl pH 8,8, 16,6 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 6,7mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoetanol), 0,5 µl de BSA 1%, 5 µl (0,4mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 4 unidades de Taq polimerasa (0,5 µl) y agua para PCR hasta un volumen final de 50 µl (Wincker *et al.*, 1994).

La amplificación consistió de dos ciclos iniciales a 98°C durante un minuto y 64°C por dos minutos; 33 ciclos intermedios de 94° C por un minuto y 64° C por un minuto y un ciclo final a 72°C por diez minutos. Además, se utilizó un control positivo consistente en DNA purificado de *T. cruzi* y un control negativo en donde la muestra fue reemplazada por 5 µl de agua bidestilada. Finalizados los ensayos se extrajo desde el amplificado de cada muestra 15 µl, los cuales se mezclaron con 5 µl de buffer de carga, al igual que ambos controles, mientras que del marcador de peso molecular (marcador de DNA de múltiplos de 100 pb) se utilizaron 2 µl mezclado con 3 µl de buffer de carga 6X azul celeste. Para la visualización del producto amplificado, que tiene un tamaño de 330 pb, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio. Las muestras se cargaron al gel el cual fue sometido a 100 volts por 45 minutos. Los resultados se observaron en un transiluminador digital de Bio Rad® con filtro de luz ultravioleta. La presencia de DNA de *T. cruzi* quedó demostrada cuando fue visible una única banda al mismo nivel de la banda de 330 pb del marcador de peso molecular y del control positivo, considerándose de esta manera, positivo el resultado.

#### ***Determinación de la variación en la detección de T. cruzi luego de una alimentación***

Los resultados de las pruebas de PCR de las muestras tomadas en la primera alimentación se compararon con aquellos resultados de las pruebas de PCR de las muestras obtenidas luego de una segunda, tercera, cuarta y quinta alimentación y fueron analizados mediante estadística descriptiva.

#### **Genotipificación de *T. cruzi* mediante Southern blot**

##### ***Transferencia del DNA a membranas por difusión simple***

Para la genotipificación de *T. cruzi* se realizó la transferencia del DNA a membranas por simple difusión. Para esto se hizo un gel en cuadruplicado con todos los resultados positivos de PCR. Posteriormente, el gel fue incubado en dos ocasiones en presencia de una solución denaturante de

NaOH 0,5 N y NaCl 1,5M durante 20 minutos cada una. Pasado ese tiempo se lavó el gel con abundante agua destilada. Luego, se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1 M pH 8,0 y NaCl 1,5M dos veces, con una agitación constante de 20 minutos cada una. Al finalizar el tratamiento, el gel se invirtió sobre un papel filtro Whatman 3MM saturado previamente con una solución de citrato de sodio salino 2x pH 7,0 (NaCl 0,3 M, Citrato de Na 0,03 M) que sirve como puente. Sobre el gel invertido se colocó una membrana de *nylon Hybond<sup>+</sup>* para la transferencia de ácidos nucleicos y papel absorbente. El sistema de transferencia quedó presionado con un peso de aproximadamente 1 kg durante una noche para así transferir el DNA por capilaridad desde el gel a la membrana de *nylon*. Una vez terminada la transferencia, el DNA se fijó a la membrana *Hybond<sup>+</sup>*, irradiando esta última con luz ultravioleta (UVC500) por dos minutos y luego se dejó secar.

### ***Preparación de la sonda***

En estos ensayos se utilizaron las sondas que detectan regiones hipervariables de los minicírculos para los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI, que fueron generadas desde los clones de los parásitos sp104, NR, CBB y V195, respectivamente. Sólo se utilizaron sondas para estos cuatro linajes, ya que son los que actualmente se sabe se encuentran presentes en nuestro país. Para confeccionar las sondas se realizó un PCR usando los primers CV1 y CV2 para cada uno de los clones a ocupar. Terminada la reacción, el producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción (ScaI y Sau 96I) utilizando las condiciones indicadas por el fabricante. Luego, se visualizó el producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez comprobado que el fragmento poseía el tamaño adecuado (270 pb), el producto se purificó previa electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se extrajo el DNA con un kit de purificación de DNA QIAGEN® dejando los fragmentos de DNA listos para la radiomarcación.

### ***Marcación radioactiva de la sonda***

Las sondas de DNA kinetoplastídico fueron marcadas utilizando el kit de marcación *Rediprime* de Amersham®. El proceso consistió en denaturalizar el DNA por calentamiento y enfriamiento rápido en hielo. En un volumen final de 50 µl la mezcla de reacción tuvo además del DNA sonda, 2U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, 5 µl de dATP marcado en posición alfa con P<sup>32</sup>, los nucleótidos dGTP, dCTP y dTTP a 1 mM, oligonucleótidos al azar y tampón de reacción incluido en el kit. La incubación se realizó por 30 min, luego de lo cual se purificó la sonda marcada por cromatografía de exclusión en resina P6 BioRad®.

### ***Hibridación con la sonda radiactiva***

El siguiente paso correspondió a la prehibridación de las membranas con una solución de hibridación (SSC 5x, reactivo bloqueador del kit 0,5% p/v, lauril sarcosinato de sodio 0,1%, SDS 0,002% p/v), en frascos de hibridación a 55°C por dos horas, distribuyendo la solución en un horno rotatorio. Luego, se eliminó al máximo la solución de hibridación y se agregaron 5 ml de solución fresca de hibridación, la cual contiene la sonda de kDNA marcada con P<sup>32</sup> previamente desnaturalizada. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 55° C. Luego se lavaron dos veces por 30 minutos a 55° C con 50 mL de solución (SSC 2x y SDS 0,1%) y dos veces por 15 minutos a 68° C en una solución de SSC 0,1x y SDS 0,1%. Finalmente, para visualizar las muestras que hibridaron con la sonda marcada, las membranas se colocaron en una pantalla cuantificadora P-imager Bio Rad®.

### **Bioseguridad**

Durante todo este trabajo, se cumplió con las normas básicas de protección radiológica, bajo la resolución N° 531/2009 de la Secretaría Regional del Ministerio de Salud.

El proyecto FONDECYT del Dr. Aldo Solari Illescas N° 1120122 posee un certificado de cumplimiento extendido por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile con fecha del 08 de Junio de 2011 (Anexo N°3) y un certificado de cumplimiento extendido por el Comité de Bioética sobre Investigación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile con fecha 16 de Agosto de 2011 (Anexo N°4).

### **Análisis de Datos**

Los resultados de las pruebas de PCR de este estudio, fueron analizados mediante estadística no paramétrica usando el Q Test de *Cochran* y el test de *McNemar* para determinar si un régimen de alimentación continua ejerce variaciones en el estado de infección de los ejemplares *M. gajardoi*.

## RESULTADOS

En el grupo de 36 *M. gajardoi* analizados en el estudio, 27 resultaron positivos a *T. cruzi*, lo que corresponde al 75% del total de ejemplares. Pasados cuarenta días se realimentaron los triatomos sobrevivientes, los que sumaron 32 individuos. Luego de la hematofagia se recolectaron, procesaron y analizaron las deyecciones dando positivos a *T. cruzi* 24 triatomos, es decir, un 75%. A los cuarenta días siguientes, se repite el procedimiento a los 23 individuos que sobrevivieron, siendo positivos a *T. cruzi* 16 triatomos, lo que equivale al 70% del grupo. El proceso se repitió cuarenta días después de la última realimentación, en el experimento solo quedaban 19 individuos, es decir, 54,29% de la muestra inicial logró sobrevivir a esta etapa del experimento. De estos, 8 resultaron positivos a *T. cruzi*, lo que corresponde al 42% del grupo. Finalmente, sólo 17 ejemplares sobrevivieron a todo el experimento (47,22%), de los cuales 10 resultaron positivos al ensayo PCR, lo que corresponde al 59% del grupo sobreviviente. Esto puede verse resumido en la Tabla N°1.

**Tabla N°1. Detección de *Trypanosoma cruzi* en *Mepraia gajardoi* capturados en Caleta Vitor luego de varias alimentaciones (A). Resumen de resultados.**

<i>M. gajardoi</i>	1era A	2da A	3era A	4ta A	5ta A
Infectado	27(75%)	24(75%)	16(70%)	8(42%)	10(59%)
No Infectado	9	8	7	11	7
Total analizado	36	32	23	19	17

Para obtener estos resultados se realizaron ensayos PCR, la cantidad de veces que fuese necesaria para acumular el material de amplificado mínimo requerido para realizar la transferencia del kDNA por cuadruplicado a la membrana de *nylon Hybond<sup>+</sup>* y así poder realizar la genotipificación mediante *Southern blot*, que permitió que se determinaran los linajes de *T. cruzi* circulantes en la muestra de triatomos. Esto resultados se pueden observar en la Tabla N°2.

**Tabla N°2. Cantidad de ensayos PCR positivos del total de PCR realizados para cada triatomino.**

N° Triatomino (estadio)	Alimentación 1		Alimentación 2		Alimentación 3		Alimentación 4		Alimentación 5	
	PCR +	TEST PCR	PCR +	TEST PCR	PCR +	TEST PCR	PCR +	TEST PCR	PCR +	TEST PCR
1 (1)	0	5								
2 (A)	0	5								
3 (A)	0	6	0	6	0	8	0	4		
4 (3)	3	9	3	15	2	12	0	9	4	9
5 (2)	4	9	3	15	4	10	0	9	4	9
6 (1)	9	13								
7 (A)	1	9	4	33						
8 (2)	6	13	6	13	4	10	0	9	2	9
9 (1)	9	16	2	15						
10 (A)	1	11	0	13	4	10	3	9	0	9
11 (A)	0	5	0	7	0	4	0	5	0	5
12 (3)	1	9	5	10	4	10	3	9	1	9
13 (2)	2	9	4	9	4	12	0	9	2	9
14 (A)	0	9	1	24						
15 (3)	1	11	2	12	1	12	0	9	2	9
16 (2)	3	9	1	22	3	16	0	9	2	9
17 (2)	11	14	5	13	2	11	0	9	4	9
18 (3)	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5
19	2	21	1	10						
20	0	5	0	6	0	6				
21	5	11	4	13						
22 (A)	6	15	2	20	0	9	0	9		
23 (4)	12	25	4	9	5	13	4	9	5	9
24 (2)	1	15	3	9	4	12	1	9	0	9
25 (4)	7	9	8	22	4	9	9	9	3	9
26 (2)	9	14								
27 (4)	9	23	2	17	3	15	4	9	0	9
28 (A)	10	16	3	9						
29 (A)	0	11	0	6						
30 (A)	12	22	1	22	0	15				
31 (A)	6	10	0	11						
32 (2)	0	9	0	9	0	9	6	9	0	9
33 (A)	9	9	7	9						
34	4	14	6	18	4	9				
35 (A)	8	12	1	9	1	9				
36 (3)	3	9	1	9	1	9	2	9	0	9

Dentro del grupo de 17 triatomos sobrevivientes que pudieron ser analizados hasta la quinta alimentación, sólo tres triatomos mantuvieron su infección durante todo el experimento (N°12, N°23 y N°25) y dos triatomos se mantuvieron constantemente negativos (N°11 y N°18). Por otra parte, 12 triatomos (N°4, N°5, N°8, N°10, N°13, N°15, N°16, N°24, N°27, N°32 y N°36) mostraron variaciones en su estado de infección entre alimentaciones como se muestra en la Tabla N°3.

El triatomo N°10 pasó de positivo a negativo en la segunda y quinta alimentación, los triatomos N°24, N°27 y N°36 resultaron negativos en la quinta alimentación (a pesar de repetirse el ensayo nueve veces) luego de haber permanecido positivos las cuatro primeras alimentaciones. El triatomo N°32 luego de resultar negativo en las tres primeras alimentaciones, cambia a positivo en la cuarta alimentación, para luego volver a resultar negativo en la quinta alimentación y los triatomos N°4, N°5, N°8, N°13, N°15, N°16 y N°17 en la cuarta alimentación presentaron resultados negativos al ensayo PCR, mientras que en el resto de las alimentaciones arrojaron resultados positivos a la presencia de *T. cruzi*. El resumen de estos resultados es posible observarlo en la Tabla N°3.

**Tabla N°3. Variación y detección de *Trypanosoma cruzi* en *Mepraia gajardoi* sometidos a un régimen de alimentación (A) continua.**

<i>M. gajardoi</i>	1era A	2da A	3era A	4ta A	5ta A
4	1	1	1	0	1
5	1	1	1	0	1
8	1	1	1	0	1
10	1	0	1	1	0
11	0	0	0	0	0
12	1	1	1	1	1
13	1	1	1	0	1
15	1	1	1	0	1
16	1	1	1	0	1
17	1	1	1	0	1
18	0	0	0	0	0
23	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	0
25	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	0
32	0	0	0	1	0
36	1	1	1	1	0



Para analizar si las variaciones observadas dentro del grupo de 17 insectos que sobrevivieron a todo el experimento fueron significativas, se utilizó el test Q de *Cochran* utilizando el software MedCalc, con un resultado de  $Q_{(4)}=11,52$ ,  $p<0.05$  y después se realizó la comparación por pares del cálculo de la estadística de prueba, para el test Q de *Cochran*, en donde no se encontraron diferencias entre las alimentaciones, como se muestra en el Anexo N°1. Los resultados indican que, si bien las proporciones de triatomos infectados y triatomos no infectados varían, estas diferencias no serían provocadas por un régimen de alimentación continua.

Por otra parte, se realizó un análisis pareado de los triatomos que habían sido analizados en dos alimentaciones consecutivas usando el test de *McNemar*.

Entre la primera y la segunda alimentación tres ejemplares mostraron cambios en su estado de infección, de un total de 32 ejemplares analizados. La prueba de *McNemar* ejecutada arrojó  $\chi^2=0$ ,  $p>0.05$ , la diferencia no es significativa y la variación en la infección de los insectos no sería responsabilidad de un régimen de alimentación libre de *T. cruzi*. Los datos se pueden ver en la Tabla N°4.

**Tabla N°4. Tabla de contingencia en donde se resumen los resultados de detección para la primera y segunda alimentación.**

	Alimentación 2 Positivos	Alimentación 2 Negativos
Alimentación 1 Positivos	23	2
Alimentación 1 Negativos	1	6

Entre la segunda y la tercera alimentación tres ejemplares mostraron cambios en su estado de infección, de un total de 25 ejemplares analizados. La prueba de *McNemar* arrojó  $\chi^2=0$ ,  $p>0.05$ , por lo que la diferencia no fue significativa. Los datos resumidos se observan en la Tabla N°5.

**Tabla N°5. Tabla de contingencia en donde se resumen los resultados de detección para la segunda y tercera alimentación.**

	Alimentación 3 Positivos	Alimentación 3 Negativos
Alimentación 2 Positivos	15	2
Alimentación 2 Negativos	1	5

Entre la tercera y la cuarta alimentación ocho ejemplares mostraron cambios en su estado de infección, de un total de 19 analizados. La prueba de *McNemar* arrojó  $\chi^2=3.125$ ,  $p>0.05$ , por lo que la diferencia no es significativa y no estaría causada por un régimen de alimentación libre de *T. cruzi*. Los datos resumidos se observan en la Tabla N°6.

**Tabla N°6. Tabla de contingencia en donde se resumen los resultados de detección para la tercera y cuarta alimentación.**

	Alimentación 4 Positivos	Alimentación 4 Negativos
Alimentación 3 Positivos	7	7
Alimentación 3 Negativos	1	4

Entre la cuarta y la quinta alimentación, doce ejemplares mostraron cambios en su estado de infección, de un total de 17 analizados. La prueba de *McNemar* arrojó  $\chi^2=0.083$ ,  $p >0.05$ . Esto indica que la diferencia no es significativa. Los datos resumidos se encuentran en la Tabla N°7.

**Tabla N°7. Tabla de contingencia en donde se resumen los resultados de detección para la cuarta y quinta alimentación.**

	Alimentación 5 Positivos	Alimentación 5 Negativos
Alimentación 4 Positivos	3	5
Alimentación 4 Negativos	7	2

Se reconocieron en la muestra los linajes circulantes TcI, TcII, TcV y TcVI en las tres primeras alimentaciones, disminuyendo su detección desde la tercera alimentación en adelante, como se muestra en la Figura N°3. Asimismo, la aparición de estos linajes se presentó en forma de infección simple (un solo linaje detectado) y de infección mixta (combinación de dos o más linajes detectados), como es posible observar en la Figura N°4 y en la Tabla N°8.

En la primera alimentación, el linaje más detectado fue TcI, con un total de doce detecciones, cinco de ellas en forma de infección simple en los triatomos N°4, N°5, N°6, N°8 y N°22 y siete en forma de infección mixta, en combinaciones: TcI-TcVI en los triatomos N°9, N°26 y N°28; TcI-TcV en el triatomo N°21; TcI-TcII-TcV en los triatomos N°17 y N°33 y TcI-TcII-TcVI en el triatomo N°27. Siguiendo el orden de detecciones, continúan los linajes TcII y TcVI, ambos con seis detecciones. Fue posible reconocer a TcII tanto en infecciones simples (triatomos N°25 y N°31), como en infecciones mixtas, en combinaciones: TcI-TcII-TcV (triatomos N°17 y N°33) y TcI-TcII-TcVI (triatomo N°27); mientras que TcVI, sólo fue detectado junto a otros linajes en forma mixta, presentándose las combinaciones: TcI-TcVI (triatomos N°9, N°26 y N°28), TcV-TcVI (triatomos N°23 y N°30) y la combinación anteriormente detallada de TcI-TcII-TcVI (triatomo N°27). Por último, TcV fue detectado en cinco triatomos (N°17, N°23, N°27, N°30 y N°33), únicamente en infecciones mixtas.

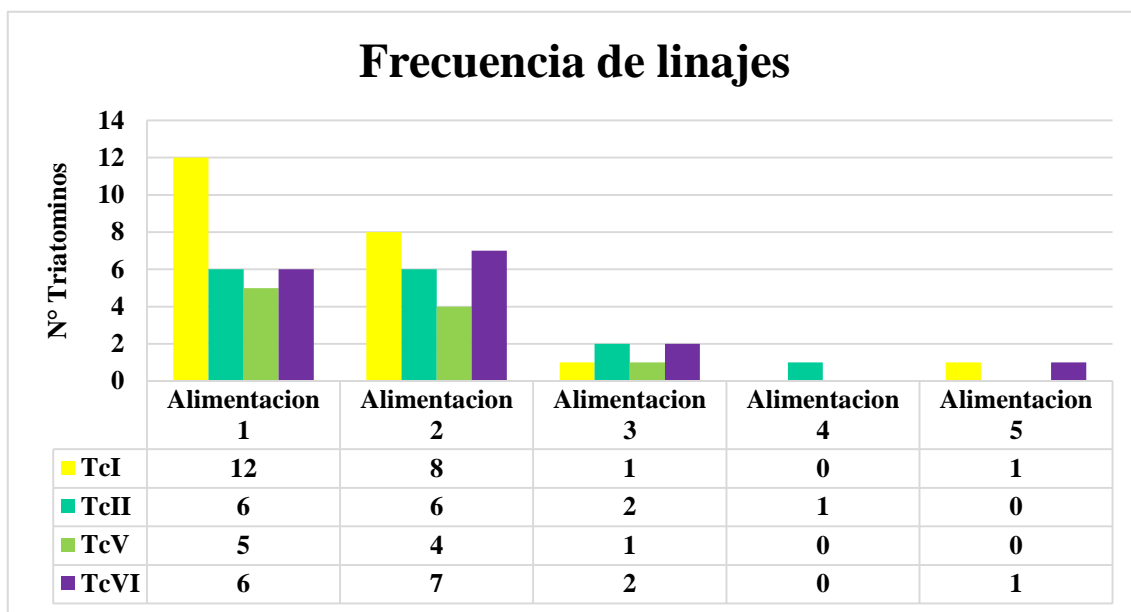
En la segunda alimentación, TcI sigue siendo el linaje detectado más frecuente, presentándose en ocho triatomino, en cuatro de ellos (N°4, N°8, N°12 y N°28) en forma de infección simple y en los cuatro restantes en infecciones mixtas con las combinaciones TcI-TcV (triatomino N°5), TcI-TcVI (triatomino N°9), TcI-TcII (triatomino N°13) y TcI-TcII-TcV (triatomino N°33). Luego, sigue TcVI, presentándose en siete triatomino, en cuatro de ellos (N°17, N°22, N°24 y N°30) en infección simple y en tres triatomino se detectó en infección mixta, presentándose las combinaciones: TcI-TcVI (triatomino N°9), TcII-TcVI (triatomino N°13 y N°23) y TcV-TcVI (triatomino N°27). TcII también se detectó en infecciones simples en los triatomino N°21 y N°25, al igual que en infecciones mixtas y TcV sólo fue detectado en infecciones mixtas.

En la tercera alimentación, la detección de todos los linajes fue menor que en las otras alimentaciones y solo se encontraron infecciones simples de TcI (triatomino N°23), TcII (triatomino N°25 y N°34), TcV (triatomino N°4) y TcVI (triatomino N°35).

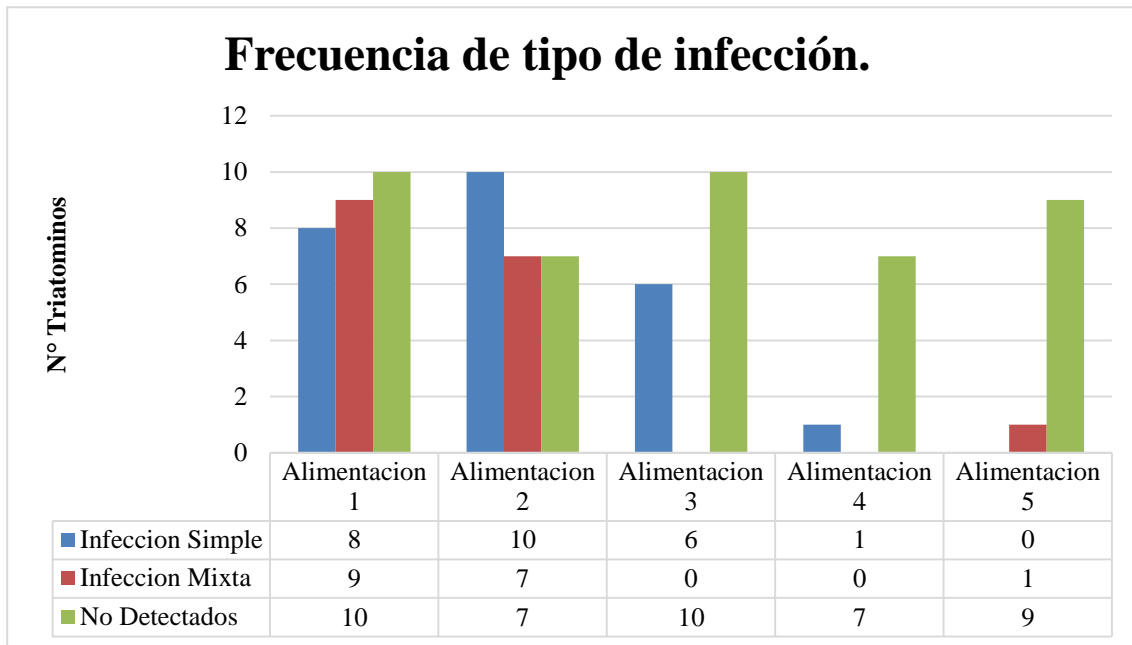
En la cuarta alimentación fue posible detectar sólo al triatomino N°25 con TcII, de los ocho positivos, y en la quinta alimentación sólo al triatomino N°4, en donde se detectó una infección mixta entre TcI y TcVI.

Nueve triatomino mostraron variaciones de los linajes detectados en el tiempo, tanto en infecciones simples como en infecciones mixtas, encontrándose en las distintas muestras, distintos linajes y distintos tipos de infección. Es así como el triatomino N°4 muestra en primera instancia infección con TcI, linaje que se repite en la segunda alimentación. En la tercera alimentación, no se detecta TcI. Sin embargo, se detectó TcV y en la quinta alimentación se detectó infección mixta TcI-TcVI. El triatomino N°5 en la primera alimentación resultó positivo para TcI mientras que en la segunda alimentación se detectó infección mixta TcI-TcV. El triatomino N°17 de infección mixta con TcI-TcII-TcV en la primera alimentación pasó a infección simple con TcVI en la segunda alimentación. El triatomino N°21 de infección mixta TcI-TcV pasó a infección simple con TcII. El triatomino N°22 mostró infección simple TcI en la primera alimentación y con TcVI en la segunda alimentación. El triatomino N°23 resultó con infección mixta TcV-TcVI en la primera alimentación, TcII-TcVI en la segunda alimentación y TcI en la tercera alimentación. El triatomino N°27 en la primera alimentación presentó infección mixta TcI-TcII-TcVI y en la segunda alimentación infección mixta TcV-TcVI. El triatomino N°28 primero se encontró infección mixta TcI-TcVI en la primera alimentación y sólo TcI en la segunda alimentación asimismo el triatomino N°30, quien presentó infección mixta TcV-TcVI en la primera alimentación y TcVI en la segunda alimentación.

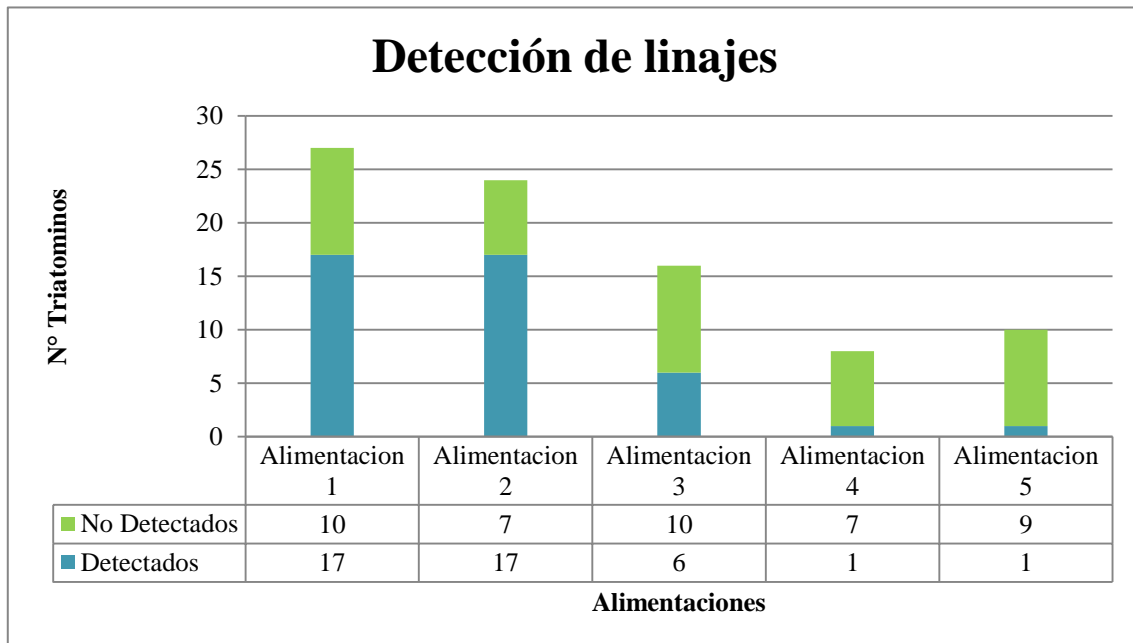
Se observa en los datos obtenidos mediante los análisis moleculares que existen distintos individuos positivos a *T. cruzi* que no dieron resultados en la genotipificación realizada en cada alimentación como se ve en la Tabla N°8 y en la Figura N°5, denominados “No Detectados”. En la Figura N°6 es posible comparar estas diferencias. En la primera alimentación, de los 27 triatominos detectados positivos, 17 fueron genotipificados mientras que diez no mostraron resultados ante la hibridación con la sonda radioactiva. En la segunda alimentación, los triatominos positivos a *T. cruzi* fueron 24, de los cuales 17 fueron detectados con las sondas genotipo específicas mientras que en 7 no se obtuvieron resultados. En la tercera alimentación el grupo infectado disminuyó a 16, de los cuales diez fueron detectados y seis no detectados. En la cuarta alimentación se detectan ocho triatominos positivos a *T. cruzi* de los cuales siete no fueron detectados y sólo un insecto fue genotipificado. Por último, en la quinta alimentación, diez triatominos resultaron positivos al ensayo PCR, mientras que solo un triatomino pudo ser genotipificado y los otros nueve no fueron detectados.



**Figura N°3. Detección de linajes de *Trypanosoma cruzi* desde *Mepraia gajardoi* capturados en Caleta Vitor.**



**Figura N°4.** Frecuencia de tipos de infección por linajes de *Trypanosoma cruzi* detectados en *Mepraia gajardoi*.



**Figura N°5.** Comparación entre grupo de *Mepraia gajardoi* analizados mediante *Southern blot* detectados y no detectados.

**Tabla N°8. Detección de linajes de *Trypanosoma cruzi* desde *Mepraia gajardoi*. (N.D.: No Detectado).**

N° Triatomino (estadio)	Alimentación 1	Alimentación 2	Alimentación 3	Alimentación 4	Alimentación 5
4 (3)	TcI	TcI	TcV		TcI-TcVI
5 (2)	TcI	TcI-TcV	N.D.		N.D.
6 (1)	TcI				
7 (A)	N.D.	N.D.			
8 (2)	TcI	TcI	N.D.		N.D.
9 (1)	TcI-TcVI	TcI-TcVI			
10 (A)	N.D.		N.D.	N.D.	
12 (3)	N.D.	TcI	N.D.	N.D.	N.D.
13 (2)	N.D.	TcI-TcII	N.D.		N.D.
14 (A)		N.D.			
15 (3)	N.D.	TcII-TcVI	N.D.		N.D.
16 (2)	N.D.	N.D.	TcVI		N.D.
17 (2)	TcI-TcII-TcV	TcVI	N.D.		N.D.
19	N.D.	N.D.			
21	TcI-TcV	TcII			
22 (A)	TcI	TcVI			
23 (4)	TcV-TcVI	TcII-TcVI	TcI	N.D.	N.D.
24 (2)	N.D.	TcVI	N.D.	N.D.	
25 (4)	TcII	TcII	TcII	TcII	N.D.
26 (2)	TcI-TcVI				
27 (4)	TcI-TcII-TcVI	TcV-TcVI	N.D.	N.D.	
28 (A)	TcI-TcVI	TcI			
30 (A)	TcV-TcVI	TcVI			
31 (A)	TcII				
32 (2)				N.D.	
33 (A)	TcI-TcII-TcV	TcI-TcII-TcV			
34	N.D.	N.D.	TcII		
35 (A)	TcII	N.D.	TcVI		
36 (3)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	

## DISCUSIÓN

Para detectar *T. cruzi*, una técnica sensible es la detección del kDNA mediante PCR, previa extracción de DNA de las muestras (Russomando *et al.*, 1996; Wincker *et al.*, 1994). Aunque ésta queda limitada por factores, como la existencia de un número crítico de parásitos o la presencia de inhibidores. Breniere *et al.* (1995) analizaron muestras fecales mediante microscopía óptica (MO), para luego realizar PCR a las muestras sin purificar (sólo fueron previamente hervidas y luego centrifugadas). Los resultados se compararon, siendo más alta la tasa de infección mediante MO que por PCR. Los autores de ese trabajo señalan, que la baja sensibilidad del PCR pudiera deberse a que no se purificó el DNA, y que dentro de la muestra y de los productos generados a partir de la lisis celular, se encuentran inhibidores de PCR. Algunos de estos inhibidores son productos de la descomposición de la sangre, los que pueden variar en cantidad dependiendo del estado de digestión de la misma en el tracto digestivo del triatomino. Al utilizar la técnica de hervir las muestras y luego centrifugarlas, previo al ensayo PCR, se disminuye el riesgo de contaminación, al no adicionar ningún otro reactivo a la muestra, pero se reporta que la sensibilidad de PCR disminuye (Breniere *et al.*, 1995) y la actividad de la *Taq*-polimerasa puede verse parcialmente inhibida (González *et al.*, 1994) debido a la presencia de inhibidores, al contrario de lo que ocurre cuando las muestras son purificadas, utilizando un kit de extracción de DNA (Wincker *et al.*, 1994). En otra experiencia, Marcet *et al.* (2006), realizaron ensayos PCR luego de purificar 38 muestras positivas a la MO, las que incluían 33 muestras de *T. infestans*, 2 de *T. guasayana* y 2 de *T. garciabesi*, encontrando positivas al ensayo sólo 30 muestras de *T. infestans*. Las tres muestras restantes de *T. infestans* y todas las muestras de las otras especies de *Triatoma* resultaron negativas; éstas fueron analizadas en busca de inhibidores, encontrándolos en cuatro de ellas. Russomando *et al.*, (1996) y Zulantay *et al.*, (2004), en sus trabajos, reportan resultados negativos al ensayo PCR debido a la presencia de inhibidores en las muestras, luego de implementar la extracción de DNA, por lo que la purificación del DNA no garantiza completamente un aumento en la sensibilidad del análisis mediante PCR. En este trabajo los ensayos PCR se repitieron al menos 9 veces por cada muestra procesada, es decir, por cada muestra hervida durante 15 minutos y posteriormente centrifugada, debido a que no siempre los resultados eran concordantes o la visualización del producto amplificado correspondiente a 330 pb era débil, mientras los controles presentaban resultados apropiados (ver Anexo N°2). Estas situaciones pudiesen ser explicadas debido a: i) la presencia de inhibidores que disminuyeran la sensibilidad del PCR y la actividad de la *Taq*-polimerasa, ii) a una baja carga parasitaria en algunos *M. gajardoi* y/o iii) falencias en la técnica del ensayo. De igual forma, el uso de la prueba PCR para detectar *T. cruzi* desde muestras sucias (no purificadas), resultó



ser sensible, aunque no se descarta que el uso de kit de purificación o de una prueba que además cuantifique la cantidad de parásitos presentes en cada muestra habrían sido de utilidad para determinar a qué se debía la visualización de bandas débiles.

La tasa de infección pesquisadas en este trabajo, comparada con los reportes anteriores de detección de *T. cruzi* desde *M. gajardoi*, difieren. De los 36 triatominos analizados, 27 fueron positivos a *T. cruzi*, lo que corresponde al 75% de insectos infectados. Este resultado es bastante mayor al reporte de Carvajal *et al.* del año 2007, donde luego de analizar las muestras mediante PCR, obtiene una tasa de infección correspondiente a un 19,2% (10 insectos positivos de 56 insectos analizados en el estudio). También es mayor al reporte de Botto-Mahan *et al.* (2008), quienes detectaron una tasa de infección correspondiente a un 11,8% (2 positivos de 17 analizados), y al reporte de Toledo *et al.* (2013), quien reportó una tasa de un 14% (56 positivos de 397 analizados), encontrando en Caleta Vitor, es decir, la localidad de captura de los ejemplares triatominos de este estudio, tasas de infección de 12,6% (19 positivos de 151 analizados). En los dos últimos trabajos mencionados, los autores señalan que una explicación al bajo nivel de infección en *M. gajardoi* estaría dada por los recursos alimenticios disponibles para los triatominos, ya que los vertebrados presentes en el sector podrían ser refractarios a la infección u hospederos terminales, en los cuales *T. cruzi* no puede mantenerse ni reproducirse. Se señala que ejemplares *M. gajardoi* han sido capturados asociados a nidos de aves marinas, cuevas de reptiles y roedores silvestres, infiriendo a estas especies como su fuente de alimentación (Botto-Mahan *et al.*, 2015). En Caleta Vitor, durante el trampeo y captura se observaron en el sector aves marinas, reptiles, roedores y mustélidos. También fue posible observar evidencias de la presencia de murciélagos, pudiendo concluir que la oferta alimentaria de la zona, al ser más variada, contribuiría a la mantención de *T. cruzi* en el sector, y a su vez, al hallazgo de tasas altas de infección en este estudio, comparando los resultados con los reportes anteriores. Otra posible explicación es la que señala Botto-Mahan *et al.* (2015) al revisar los datos encontrados por Egaña *et al.* (2014). Egaña *et al.*, el año 2014, detectó un 20% de *M. gajardoi* infectados (14 positivos de 70 analizados) capturados en la localidad de Vitor. Luego de una alimentación artificial con *Mus musculus*, este porcentaje aumentó a un 74,6% (47 positivos de 62 analizados), lo que indicaría, según Botto-Mahan *et al.* (2015), que los niveles de infección evaluados en ejemplares en ayuno podrían estar subestimados. Este aumento en la tasa de infección, influenciada por una alimentación en laboratorio, no fue replicado en el presente estudio, a pesar de utilizar metodologías similares. Como se señaló anteriormente, en una primera alimentación, luego de la captura en terreno, los ejemplares de *M. gajardoi* arrojaron un 75% como tasa de infección y luego, en una segunda alimentación, este porcentaje se mantuvo en un 75%. Los resultados entre la primera y

segunda alimentación se analizaron bajo la prueba de *McNemar* mostrando que las diferencias no eran significativas, deduciendo que éstas eran producidas por otros factores y no a una realimentación continua. Si bien la detección de *T. cruzi* varía entre las realimentaciones a las cuales se sometieron los triatomíneos, tendiendo a la baja, estas diferencias no fueron significativas. La mayor variación entre el grupo de triatomíneos infectados versus el grupo de triatomíneos no infectados se puede observar entre la tercera y la cuarta alimentación, en donde el porcentaje de detección desciende de un 70% a un 42%. Estos resultados se analizaron mediante la prueba de *McNemar*, siendo esta diferencia no significativa. La situación se revierte ligeramente al comparar las tasas de infección entre la cuarta y la quinta alimentación, en donde el porcentaje de infectados llegó a un 59% del grupo analizado, aunque esta diferencia, nuevamente, no fue significativa, analizando los resultados mediante la prueba de *McNemar*.

En cada alimentación algunas muestras de triatomíneos no pudieron ser genotipificadas utilizando las sondas sp104, NR, CBB y V195 que detectan regiones hipervariables de los minicírculos para los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI, respectivamente. Esto pudiese explicarse debido i) a la presencia de linajes distintos a los utilizados para generar las sondas, ii) linajes distintos a los analizados en este estudio que se han reportado circulantes en muestras sanguíneas de perros provenientes de la región de Tarapacá (Ortiz *et al.*, 2016), tales como TcIII, o iii) baja carga parasitaria, debido a que realimentaciones continuas con *Mus musculus* no infectados parecen desmedran la población de *T. cruzi* al interior del tracto digestivo de los triatomíneos.

Los linajes encontrados en este trabajo fueron TcI, TcII, TcV y TcVI, como describe Solari *et al.* (2001), tanto en infecciones simples como mixtas. A diferencia de lo pesquisado por Botto-Mahan *et al.* (2008), quienes señalan la detección de infección simple con TcII en un ejemplar *M. gajardoi*, y por lo reportado en Toledo *et al.* (2013), quienes encontraron solo la presencia de TcII en la mayoría de los ejemplares *M. gajardoi*, con una alta prevalencia. En ese estudio también se hallaron los linajes TcI y TcV. Torres, *et al.* (2004) describen que en las regiones de Arica y Parinacota y Antofagasta los linajes frecuentemente encontrados en pacientes chagásicos y en *T. infestans* fueron TcI, TcII y TcVI, lo que concuerda con los datos recabados en esta experiencia analizando *M. gajardoi*, en donde el linaje con mayor frecuencia corresponde a TcI y es seguido por TcVI y TcII. En este estudio se encontró que nueve triatomíneos mostraron variación temporal en los linajes detectados, pudiendo observar que las poblaciones de los distintos linajes de *T. cruzi* dentro *M. gajardoi* son dinámicas cuando están sujetas a disponibilidad continua de alimento (realimentaciones cada 40 días). En el caso de los triatomíneos N°28 y N°30, luego de una infección

mixta detectada en la primera alimentación, al re-alimentarse desaparece uno de los linajes encontrados, o casos como los triatominos N°17, N°21 y N°22 que en los distintos análisis resultaron positivos a *T. cruzi*, encontrándose en cada ensayo distintos linajes. Esta dinámica en las poblaciones de *T. cruzi* al interior de *M. gajardoi* pudiese explicarse por alteraciones mutuas en los patrones de infección, debido a la competencia por un mismo nicho orgánico dentro del mismo hospedero (Araújo, *et al.*, 2007) o por fallas al ejecutar la técnica.

Dentro del grupo de triatominos analizados, cabe destacar la presencia de dos insectos en cuyos análisis se logró detectar infección con *T. cruzi* permanentemente, y que sobrevivieron a todo el estudio. Estos triatominos corresponden a los insectos N°23 y N°25. Sus resultados al PCR fueron siempre positivos a la detección de *T. cruzi*, N°23 mostrando en la primera alimentación infección mixta con los linajes TcV y TcVI, en la segunda alimentación infección mixta con TcII y TcVI, y en la tercera alimentación infección simple con TcI. Lo mismo ocurre con el triatomino N°25, en el cual se detectó permanente infección simple con TcII. Esto hace pensar que el parasitismo por parte de *T. cruzi* no es patológico para *M. gajardoi*, mientras éste se encuentre en un régimen de alimentación continua. En otros sistema de parasitismo, como el sufrido por *Rhodnius* debido a *T. rangeli*, el parásito es patógeno para el insecto debido a que desmedra la población de bacterias simbioses necesarias para los procesos digestivos del vector (Vallejo, *et al.*, 2009), atraviesa la pared intestinal e invade el hemocele del insecto, produce una inhibición de la respuesta inmune celular y humoral, lo que permite la multiplicación del parásito en la hemolinfa, invadiendo los hemocitos y las glándulas salivares (Vallejo, *et al.*, 2015). En la caso de *M. spinolai* – *T. cruzi* se ha descrito que el parásito sólo ejerce cambios en la conducta de picada (Botto-Mahan, 2009) y que *T. cruzi*, a nivel general, afecta al vector en situaciones de ayuno prolongado o inanición, siendo subpatogénico para el triatomino (Schaub, 1994).

Luego de capturados los triatominos y someterlos a realimentación continua con *Mus musculus* libres de *T. cruzi* la infección se mantiene, incluso pasadas 20-25 semanas post-captura, consiguiendo concluir que *M. gajardoi* esta naturalmente infectado con *T. cruzi* y que esta infección se logra mantener al ser realimentados con *Mus musculus* no infectados.

## CONCLUSIÓN

*Mepraia gajardoi* está naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi*.

La infección por *T. cruzi* en *M. gajardoi* se mantiene bajo condiciones de realimentación continua, con una tasa que tiende a la baja, no pudiendo ser explicado este descenso por el régimen de realimentación permanente.

En este estudio se pesquisa una tasa de infección mayor a las reportadas anteriormente, siendo un potencial peligro para la salud pública.

Los linajes presentes de *T. cruzi* en *M. gajardoi* corresponden a los cuatro linajes descritos para Chile.

Los linajes de *T. cruzi* en *M. gajardoi* pueden presentarse como infecciones mixtas o infecciones simples, presentándose estas variables en el tiempo.

## REFERENCIAS

- **APT, W., HEITMANN, I., JERCIC, M. I., JOFRÉ, L., MUÑOZ, P., NOEMÍ, I., SAN MARTÍN, A., SAPUNAR, J., TORRES, M., ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Revista Chilena de Infectología*, 25(3), 189–193.
- **ARAÚJO, C., CABELLO, P. & JANSEN, A.** 2007. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *In vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Tropica*, 101(3), 225–231.
- **AUFDERHEIDE, A., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHL, F., ARRIAZA, B., RENIER, C., WITTMERS, L., FORNACIARI, G., ALLISON, M.** 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2034–2039.
- **BACIGALUPO, A., SEGOVIA, V., GARCÍA, A., BOTTO-MAHAN, C., ORTÍZ, S., SOLARI, A., ACUÑA-RETAMAR, M., TORRES-PÉREZ, F., CATTAN, P.** 2012. Differential pattern of infection of sylvatic nymphs and domiciliary adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* genotypes in Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 473–80.
- **BOTTO-MAHAN, C., SEPÚLVEDA, 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 Tropica*, 105, 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 and Zoonotic Diseases*, 9(5), 505–510.
- **BOTTO-MAHAN, C., CORREA, J., BACIGALUPO, A., CAMPOS-SOTO, R., CATTAN, P. E., & SOLARI, A.** 2015. Ecología de los triatomíneos silvestres endémicos de Chile. *Parasitología Latinoamericana*, 64(3), 12–19.
- **BRENIERE, S., BOSSENO, M., TELLERIA, J., CARRASCO, R., VARGAS, F., YAKSIC, N., & NOIREAU, F.** 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomíneos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(2), 179–84.
- **CARVAJAL, A., ORELLANA, J., WIGANT, W., BORQUEZ, C., & LOBATO, I.** 2007. Prevalence of triatomíneos infected with *Trypanosoma cruzi* in the coast of Arica city. *Parasitología Latinoamericana*, 62(3–4), 118–121.
- **CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*.
- **DE SOUZA, W.** 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(May), 89–100.

- **EGAÑA, C., VERGARA, F., CAMPOS, R., ORTIZ, S., BOTTO-MAHAN, C., & SOLARI, A.** 2014. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Mepraia gajardoi* and *Mepraia spinolai*: The Effect of Feeding Nymphs from the Field. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 534–536.
- **FUENZALIDA, F.** 2015. Enfermedad de Chagas (CIE 10: B57.0-B57.5; Z22.8; Y P00.2) Situación Epidemiológica, Enero-Diciembre, 2014. (2015).
- **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. *Neotropical Entomology*, 39(4), 572–583.
- **FRIAS, D., HENRY, A., & GONZALEZ, C.** 1998. *Mepraia gajardoi*: a new species of tritominæ (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 71, 177–188.
- **GONZÁLEZ, N., GALINDO, I., GUEVARA, P., NOVAK, E., SCORZA, J., AÑEZ, N., DA SILVEIRA, J., RAMÍREZ, J.** 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(1), 153–8.
- **KOLLIEN, A. & SCHAUB, G.** 1998. The Development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the Reduviid Bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of Starvation. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1), 59–63.
- **KOLLIEN, A., & SCHAUB, G.** 1998. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1), 166–170.
- **KOLLIEN, A., & SCHAUB, G.** 1999. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector - a review. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 23(6), 335–340.
- **KOLLIEN, A. & SCHAUB, G.** 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(9), 381–387.
- **LORCA, M., GARCÍA, A., BAHAMONDE, M., FRITZ, A., & TASSARA, R.** 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. *Revista Médica de Chile*, 129(3), 264–269.
- **MARCET, P., DUFFY, T., CARDINAL, M., BURGOS, J., LAURICELLA, M., LEVIN, M., KITRON, U., GÜRTLER, R., SCHIJMAN, A.** 2006. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*, 132(Pt 1), 57–65.

- **MARCILI, A., LIMA, L., CAVAZZANA, M., JUNQUEIRA, A., VELUDO, H., MAIA DA SILVA, F., CAMPANER, M., PAIVA, F., NUNES, V., TEIXEIRA, M.** 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6), 641.
- **MILES, M., SOUZA, A., POVOA, M., SHAW, J., LAINSON, R., & TOYE, P.** 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272(5656), 819–21.
- **NOIREAU, F., DIOSQUE, P., & JANSEN, A.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, 40(2), 26.
- **OMS.** 2015. Centro de prensa La enfermedad de Chagas ( tripanosomiasis americana ), 1–5.
- **ORELLANA-HALKYER, N., & ARRIAZA-TORRES, B.** 2010. Chagas disease in prehistoric populations of northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83, 531–541.
- **ORTIZ, S., CEBALLOS, M. J., GONZÁLEZ, C. R., REYES, C., GÓMEZ, V., GARCÍA, A., & SOLARI, A.** 2016. *Trypanosoma cruzi* diversity in infected dogs from areas of the north coast of Chile. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 5, 42–47.
- **ROTHHAMMER, F., STANDEN, V., NÚÑEZ, L., ALLISON, M., & ARRIAZA, B.** 1984. Origen y desarrollo de la Tripanosomiasis en el área Centro-Sur Andina. *Chungara*, 12, 155–160.
- **ROTHHAMMER, F., ALLISON, M., NÚÑEZ, L., STANDEN, V., & ARRIAZA, B.** 1985. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(4), 495–498.
- **RUSSOMANDO, G., ROJAS DE ARIAS, A., ALMIRON, M., FIGUEREDO, A., FERREIRA, M. E., & MORITA, K.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 83, 62–66.
- **SAGUA FRANCO, H., ARAYA ROJAS, J., GONZÁLEZ CORTES, J., & NEIRA CORTES, I.** 2000. *Mepraia spinolai* in the Southeastern Pacific Ocean coast (Chile) - first insular record and feeding pattern on the Pan de Azúcar island. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2), 167–70.
- **SCHAUB, G., & LOESCH, P.** 1988. *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 65(2), 174–186.
- **SCHAUB, G.** 1989. *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 68(3), 260–273.
- **SCHAUB, G. A.** 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, 10(12), 463–468. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90155-4)

- **SCHOFIELD, C.** 2000. *Trypanosoma cruzi* - The Vector-parasite Pradox. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4), 535–544.
- **SOLARI, A., CAMPILLAY, R., ORTÍZ, S., & WALLACE, A.** 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Experimental Parasitology*, 97(4), 226–233.
- **STEVENS, J. R., NOYES, H. A., SCHOFIELD, C. J., & GIBSON, W.** 2001. The molecular evolution of *trypanosomatidae*. *Advances in Parasitology Volume 48. Advances in Parasitology (Vol. 48)*.
- **TEIXEIRA, A. R. L., HECHT, M. M., GUIMARO, M. C., SOUSA, A. O., & NITZ, N.** 2011. Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592–630.
- **TIBAYRENC, M., WARD, P., MOYA, A., & AYALA, F. J.** 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(1), 115–119.
- **TOLEDO, A., VERGARA, F., CAMPOS, R., BOTTO-MAHAN, C., ORTÍZ, S., & SOLARI, A.** 2013. *Trypanosoma cruzi* genotypes in *Mepraia gajardoi* from wild ecotopes in northern Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 285–288.
- **TORRES, J. P., ORTIZ, S., MUÑOZ, S., SOLARI, A., MUNOZ, 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(Pt 2), 161–168.
- **TOSO, A., VIAL, F., & GALANTI, N.** 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Medica De Chile*, 139(2), 258–266.
- **VALLEJO, G. A., GUHL, F., & SCHAUB, G. A.** 2009. *Triatominae – Trypanosoma cruzi / T. rangeli*: Vector – parasite interactions. *Acta Tropica*, 110, 137–147.
- **VALLEJO, G. A., SUÁREZ, Y., OLAYA, J. L., GUTIÉRREZ, S. A., & CARRANZA, J. C.** 2015. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales.*, 39(150), 111–122.
- **WESTENBERGER, S. J., BARNABÉ, C., CAMPBELL, D. A., & STURM, N. R.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171(2), 527–43.



- **WHO, T.** 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf)
- **WINCKER, P., BRITTO, C., PEREIRA, J. B., CARDOSO, M. A, OELEMANN, W., & MOREL, C. M.** 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(6), 771–777.
- **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. G.** (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054.
- **ZULANTAY, I., HONORES, P., SOLARI, A., APT, W., ORTIZ, S., OSUNA, A., ROJAS, A., LÓPEZ, B., SÁNCHEZ, G.** 2004. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48, 253–257.

## ANEXOS

### Anexo N°1. Resultados del test Q de Cochran arrojados por el software MedCalc.

Cases in spreadsheet	17
Cases with missing values	0
Cases included in the analysis	17

#### Frequencies

Variable	Value		Proportion (%)
	0	1	
1Alim_infectada	3	14	82,35
2Alim_infectada	4	13	76,47
3Alim_infectada	3	14	82,35
4Alim_infectada	9	8	47,06
5Alim_Infectada	7	10	58,82

#### Cochran's Q test

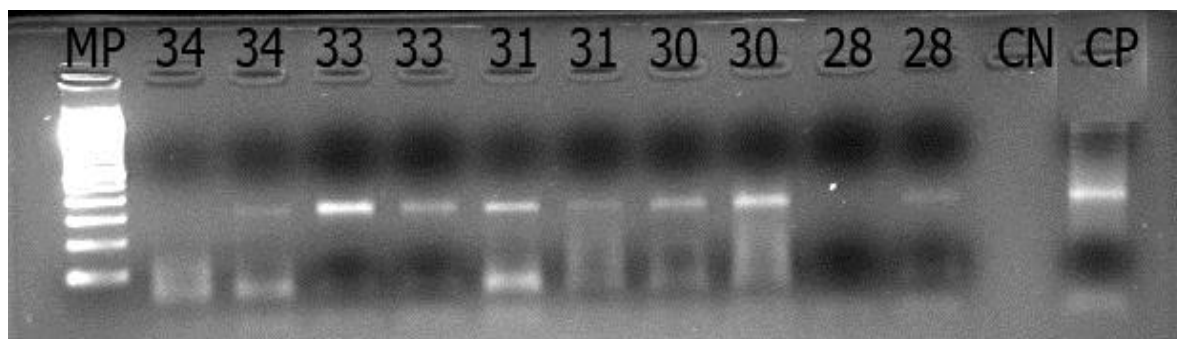
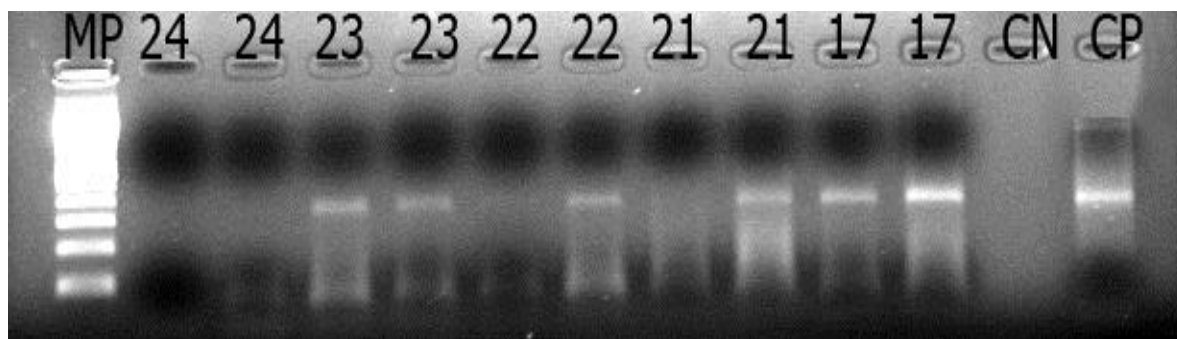
n	17
Cochran's Q	11,5200
DF	4
Significance	0,021

#### Multiple comparisons

Variable	Different (P<0,05) from variable nr
(1) 1Alim_infectada	
(2) 2Alim_infectada	
(3) 3Alim_infectada	
(4) 4Alim_infectada	
(5) 5Alim_Infectada	

Minimum required difference (%): 36,9219

Anexo N°2. Las imágenes superior e inferior corresponden a un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular. Los números sobre los carriles indican la muestra analizada en 2 oportunidades. Las bandas observadas corresponden a las 330 pb. Para cada muestra se realizó una repetición. MP: marcador de peso; CN: control negativo; CP: control positivo.



**Anexo N°3. Certificado de cumplimiento extendido por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile con fecha del 08 de Junio de 2011.**



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

Santiago, June 08<sup>th</sup> 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 1<sup>st</sup> edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2<sup>nd</sup> edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> 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 **Mónica 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](mailto:biosegur@med.uchile.cl) [upr@med.uchile.cl](mailto:upr@med.uchile.cl)



Anexo N°4. Certificado de cumplimiento extendido por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE  
INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

# Comité de ética

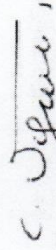
## CERTIFICACIÓN

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 Salenzuela Y.  
Presidente