

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROSATÉLITES  
POLIMÓRFICOS EN *Trypanosoma cruzi*

Emiliana Paola del Rosario Rivera Muñoz

Guatemala

2003



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROSATÉLITES  
POLIMÓRFICOS EN *Trypanosoma cruzi*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROSATÉLITES  
POLIMÓRFICOS EN *Trypanosoma cruzi*

Trabajo de investigación presentado por  
Emiliana Paola del Rosario Rivera Muñoz  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Bioquímica

Guatemala

2003

Vo. Bo. :

(f) Pamela Pennington

Dra. Pamela Pennington

Asesor

Tribunal:

(f) Pamela Pennington

Dra. Pamela Pennington

(f) Celia Córdon Morán

Licda. Celia Córdon

(f) José H. Aguilar

Dr. José Hector Aguilar

Fecha de aprobación: 22 de Octubre del 2003

## PREFACIO

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* y transmitido a los seres humanos por los insectos infectados de la familia Triatominae. La enfermedad afecta el continente americano y, en términos de salud pública e impacto económico, es la infección parasitaria más importante en Latinoamérica. De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud se estima que el nueve por ciento de la población guatemalteca está infectada y que el cincuenta y dos por ciento está en riesgo (OPS, 1991).

A escala molecular del ADN, la habilidad de caracterizar cepas y clones del *Trypanosoma cruzi* es fundamental para el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad. El parásito consiste en una población heterogénea compuesta de varias cepas que circulan en la naturaleza entre los vectores, los reservorios silvestres, los animales domésticos y el ser humano. El aislamiento y estudio de poblaciones de varios orígenes demostró la presencia de un amplio rango de cepas con características biológicas, inmunológicas, bioquímicas y farmacológicas. Con el fin de contribuir a la tipificación del parásito, en el presente trabajo se identificaron tres locus correspondientes a microsatélites y se caracterizaron con muestras recolectadas en las regiones endémicas de Guatemala, Panamá, Ecuador y Brasil.

Para realizar el estudio se construyó una librería genómica, en la cual se identificaron los fragmentos que contenían microsatélites. Estos se amplificaron, clonaron y secuenciaron. En una segunda parte se caracterizaron los microsatélites, amplificándolos en 43 aislados de *T. cruzi*. Una de las principales limitaciones del análisis fue la utilización de muestras no clonadas, lo cual dificultó el registro de alelos verdaderos.

Esta investigación fue financiada por los proyectos “Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* as a determinant of myocardial tropism”, de TDR/WHO, número A10322, Investigadora Principal Pamela Pennington; “Latin american network for research on the biology and control of triatominae”, de ECLAT, Coordinadora Nacional Celia Córdón y “Gorgas Memorial Research Award of the American Society for Tropical Medicine and Higiene”, Investigadora Principal Pamela Pennington. Además, las muestras de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en el proyecto, fueron recolectadas durante el proyecto “Encuesta entomológica basal en 6 departamentos del área endémica para la enfermedad de Chagas”, de TDR/WHO, no. 990545, Investigadora Principal Licda. Celia Córdón. La parte práctica del estudio se llevó a cabo en

los laboratorios del Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala y Unidad de Investigación y Adiestramiento en Entomología Médica-Guatemala (MERTUG), del Centro de Control y Prevención de Enfermedad de Estados Unidos, o CDC por sus siglas en inglés *Center for Disease Control and Prevention* en Atlanta, Estados Unidos.

Este estudio se llevó a cabo gracias a la ayuda de varios colaboradores. Entre los cuales se agradece a: **Dr. Pamela Pennington** por haber brindado la oportunidad de iniciar la práctica científica en un laboratorio equipado con tecnología de punta y por compartir sus conocimientos y experiencia a lo largo de todo el proceso. A **Dr. Maria Eugenia Morales** por su capacidad didáctica, consejos, apoyo y paciencia. A **Alejandra y Carmen Lucía** por su constante apoyo en el ámbito profesional y personal. A **Renata, Edgar, Cynthia, Bernarda, Alejandra K., Roberto** y demás personas del laboratorio por su ayuda. A **Fredy** por su ayuda en el análisis de datos. Al **Dr. Ben Beard** por permitir trabajar en su laboratorio. A **Gena Groner** por facilitar su ayuda y experiencia en el uso del equipo de electroforesis capilar en el laboratorio del CDC. A **Licda. Celia Cerdón, Dr. Mario Grijalva y Franklyn Samudio** por facilitar las muestras de *T. cruzi* de Guatemala, Ecuador y Panamá respectivamente. A demás amigos y personas que de alguna forma contribuyeron a la realización del presente estudio.

Quisiera dedicar la tesis a mis papás, **Ariel y Marina**; a mis hermanos, **Alexandra, Anawarki, Ajarik**; y a mi novio **Juan Pablo** por su constante entusiasmo, apoyo y cariño.

# CONTENIDO

	Página
PREFACIO	iv
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICAS	xiv
RESUMEN	xv
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
A. Enfermedad de Chagas	2
1. Generalidades	2
2. Agente infeccioso <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
3. Patogénesis	4
4. Epidemiología	6
5. Vectores	8
B. Genética molecular	11
1. Organización del genoma	11
2. Métodos de detección de diversidad genética	13
a. Electroforesis de isoenzimas	13
b. ADN polimórfico amplificado al azar “Randomly Amplified Polymorphic DNA”, RAPD’s, por sus siglas en inglés	14
c. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN kinetoplastídico “Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplastid DNA”, RFLP de kDNA, por sus siglas en inglés	15
d. Secuencias únicas: microsátélites	16
1) Definición	16
2) Biología	16
3) Aplicación	18
C. Estudios en microsátélites polimórficos identificados en <i>Trypanosoma cruzi</i>	18

D.	Genética de poblaciones	20
1.	Frecuencia alélica en las poblaciones	20
2.	Equilibrio en una población	21
3.	Polimorfismo de microsatélites	21
4.	Índice de Simpson	22
5.	Coefficiente de similaridad y distancia genética de Nei-Li	22
6.	Método de agrupación aglomerativo, <i>Agglomerative Nesting</i> , AGNES, por sus siglas en inglés	23
7.	Similaridad y distancia genética de Nei en poblaciones	24
III.	HIPÓTESIS	25
IV.	OBJETIVOS	26
A.	Objetivo general	26
B.	Objetivos específicos	26
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
A.	Construcción de librería genómica, rica en microsatélites	28
1.	Extracción de ADN total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
2.	Cuantificación de ADN en fluorómetro	28
3.	Aislamiento de fragmentos de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> ricos en microsatélites	29
B.	Amplificación y clonación de fragmentos ricos en microsatélites	29
1.	Amplificación de fragmentos de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> , ricos en microsatélites, mediante la reacción en cadena de la polimerasa	29
2.	Purificación del producto de la reacción en cadena de la polimerasa	30
3.	Ligación al vector del producto de la reacción en cadena de la polimerasa purificado	30
4.	Transformación del vector con el inserto	30
C.	Cultivo y tamizaje de colonias transformadas	31
D.	Secuenciación de clones positivos	31
E.	Análisis de secuencias e identificación de microsatélites	32
F.	Diseño de cebadores	32
G.	Selección de muestras	34
H.	Análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar	35
I.	Análisis genético de microsatélites	40

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
A. Clonación de los fragmentos de ADN genómico de <i>Trypanosoma cruzi</i> ricos en microsatélites	41
B. Secuenciación de colonias positivas	43
C. Diseños de cebadores y amplificación de microsatélites mediante reacción en cadena de la polimerasa	45
D. Análisis de microsatélites por electroforesis capilar	47
E. Análisis genético de los microsatélites	52
1. Frecuencias alélicas de los individuos estudiados	52
2. Equilibrio de Hardy-Weinberg	60
3. Índice de similitud y distancia genética de Nei-Li	61
4. Índice de Simpson	68
5. Identidad y distancia genética de Nei	68
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. RECOMENDACIONES	74
IX. LITERATURA CITADA	77
X. APÉNDICES	82
A. Glosario	82
B. Protocolo para aislamiento de fragmentos de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> ricos en microsatélites	92
C. Secuencia de clon E.3.13 para pre-análisis	93
D. Secuencias de clones positivos por PCR secuenciados	94
E. Secuencias correspondientes a genes	105
F. Interferogramas correspondientes a aislados escogidos para análisis	106
1. MS3	106
2. MS5	113
3. MS6	122
G. Alelos reales registrados para los microsatélites MS3, MS5 y MS6	130

H.	Matriz de índice de similitud de Nei-Li	140
1.	MS3 Completo	140
2.	MS3 Parcial	143
3.	Tomando en cuenta el MS3 parcial y corrigiendo el tamaño del alelo 241pb. en MS6	146
I.	Matriz de distancia genética basada en índice de similaridad de Nei-Li.	149
1.	MS3 Completo	149
2.	MS3 Parcial	152
3.	Tomando el MS3 parcial y corrigiendo el tamaño del alelo de 241pb. en MS6	155
J.	Genotipos de aislados de <i>T. cruzi</i> por país	158
1.	Leyenda de asignación de genotipos	158
a.	Muestras con MS3 parcial	158
b.	Muestras con MS3 parcial y corrección del tamaño del alelo 241pb. en MS6	159
2.	Genotipos correspondientes de muestras analizadas	160
a.	Muestras con MS3 parcial	160
b.	Muestras con MS3 parcial y corrección del tamaño del alelo 241pb. en MS6	162

# LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro	
1. Situación de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en los países de Centroamérica	7
2. Datos epidemiológicos y tratamientos para la enfermedad de Chagas	7
3. Grandes familias de genes en el <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
4. Comparación de características de tres marcadores moleculares: Isoenzimas, RAPD's y Microsatélites	16
5. Ejemplos de las seis clases de microsatélites	18
6. Análisis de polimorfismo de microsatélites diseñados en Brasil con muestras de aislados provenientes de Guatemala	20
7. Mezclas de oligonucleótidos utilizados durante el enriquecimiento del ADN genómico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el Laboratorio de Savannah Ecology	29
8. Descripción de los aislados de <i>T. cruzi</i> analizados de Guatemala, Panamá, Ecuador y Brasil	36
9. Eficiencia de ligación en eluciones enriquecidas 2, 3 y 4	42
10. Resultados obtenidos en tamizaje por el gen de la $\beta$ -galactosidasa y por la reacción en cadena de la polimerasa	42
11. Eficiencia de reisolamiento de insertos en clones positivos de acuerdo a tamizaje por reacción en cadena de la polimerasa	43
12. Microsatélites identificados manualmente en los clones secuenciados	44
13. Diseño de cebadores para secuencias de microsatélites identificados para el <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
14. Optimización de reacción de corrida en equipo de electroforesis capilar	48

15.	Determinación preliminar de polimorfismo en microsatélites MS1, MS2, MS3, MS5, MS6 y MS10	49
16.	Detección de fragmentos amplificados por MS1, MS3, MS5, MS6 y MS10 en el secuenciador automático	50
17.	Porcentaje de muestras con mezcla de parásitos de acuerdo a razón altura contra área de pico amplificado para cada microsatélite y en conjunto	52
18.	Diversidad genética por locus y por país	58
19.	Datos promedios por país en los locus MS3, MS5 y MS6	59
20.	Comparación de heterocigosidad y número de alelos obtenidos mediante isoenzimas y microsatélites	60
21.	Índice de Simpson (D)	68
22.	Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I (Locus MS3 completo)	68
23.	Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I (Locus MS3 parcial)	69
24.	Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I (Locus MS3 parcial y corrección de alelo de 240pb de MS6)	70

# LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura	
1. Dibujo esquemático, basado en información obtenida del microscopio electrónico, identificando las estructuras del <i>Trypanosoma cruzi</i> en su estadio epimastigote	3
2. Vector de la enfermedad de Chagas en el proceso de defecar	3
3. Formas de desarrollo del <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
4. Representación esquemática del ciclo de vida del protozoo flagelado <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
5. Patología cardíaca y digestiva de la enfermedad de Chagas	6
6. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	6
7. El ciclo de transmisión natural del <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
8. Distribución geográfica de los principales vectores triatominos	9
9. Vectores principales de la enfermedad de Chagas	11
10. Repeticiones de microsátélites y regiones de baja complejidad en el genoma del <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
11. Modelo de mutación de los microsátélites: desapareamiento de hebra por corrimiento ( <i>slipped-strand mispairing</i> )	17
12. Lugar de colecta de los triatominos a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de <i>T. cruzi</i> en la República de Panamá	37
13. Lugar de colecta de los triatominos domésticos a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de <i>T. cruzi</i> en la República de Guatemala	38
14. Lugar de colecta de los reservorios a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de <i>T. cruzi</i> en la República de Ecuador	39

15.	Detección del ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> enriquecido con microsatélites amplificado con el cebador SSNX	41
16.	Esquema de localización de los cebadores M13F y M13R con respecto al inserto en el vector pGEMt easy	42
17.	Microsatélites amplificados en aislados de <i>T. cruzi</i> al utilizar pares de cebadores diseñados bajo dos condiciones de temperatura de hibridación	46
18.	Dendrograma de 40 aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> basado en la distancia genética de Nei-Li	
	A. Tomando locus MS3 completo	63
	B. Tomando locus MS3 parcial	64
	C. Tomando locus MS3 parcial y corrección del tamaño del alelo de 241pb. en MS6	65
19.	Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 completo)	69
20.	Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 parcial)	70
21.	Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 parcial y corrección de alelo de 240pb de MS6)	71

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Frecuencia de alelos nulos por microsatélite y por país	53
2. Frecuencia alélica en locus MS3 completo por país	54
3. Frecuencia alélica en locus MS3 parcial por país	54
4. Frecuencia alélica en locus MS5 por país	55
5. A. Frecuencia alélica en locus MS6 por país	56
B. Frecuencia alélica en locus MS6 (corrigiendo alelo) por país	56
6. Patrón alélico promedio por país	59
7. Frecuencias de genotipos en <i>T. cruzi</i> por departamento y por país MS3 parcial	
A. Por país	66
B. Por departamento de Guatemala y por país	66
8. Frecuencia de genotipos en <i>T. cruzi</i> por departamento y por país con MS3 parcial y corrección del alelo de 241pb. en MS6	
A. Por país	67
B. Por departamento de Guatemala y por país	67

## RESUMEN

En este trabajo se identificaron locus correspondientes a microsatélites polimórficos en el genoma del *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Para ello, se construyó una librería genómica rica en microsatélites utilizando el método de captura magnética por afinidad, se clonaron los fragmentos y se secuenciaron los clones positivos para poder identificar y caracterizar los microsatélites. Los microsatélites seleccionados se analizaron con 43 aislados de *Trypanosoma cruzi*, provenientes de Guatemala, Panamá, Ecuador y Brasil; hospederos de varias especies de triatomíneos (*Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens*), mamíferos reservorios y humanos. Los alelos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa se detectaron por electroforesis capilar.

Se consideraron polimórficos aquellos microsatélites cuyo alelo predominante tuviera una frecuencia alélica menor al 95%. A partir de esto, se obtuvieron tres microsatélites polimórficos para las muestras provenientes de Guatemala, Panamá y Ecuador, y dos microsatélites polimórficos para las muestras de Brasil. La marcada diferencia entre la heterocigosidad observada y esperada indicó una desviación de Hardy-Weinberg, tal como se esperaba. Para caracterizar la población se determinó la distancia genética de Nei Li y se tipificó cada aislado por medio del genotipo correspondiente. Basándose en la distancia genética de Nei Li, los aislados formaron dos grupos principales; aunque la separación no fue tan clara posiblemente debido al reducido número de microsatélites analizados. Finalmente, el origen geográfico de las muestras se pudo diferenciar casi en un cien por cien por medio de los genotipos identificados.

El análisis a través de secuencias microsatélites demostró que representan un marcador molecular con la capacidad de cuantificar la diversidad del *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, se debería de aumentar el número de microsatélites y muestras para que los resultados sean representativos.

# I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es generada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite principalmente por los insectos hematófagos de la familia Reduviidae, sub familia Triatominae. En las últimas décadas, también se han visto casos de transmisión por transfusión sanguínea o transplacentaria. De acuerdo a informes de la Organización Mundial de la Salud, en 1991, se estima que la enfermedad afecta entre 16-18 millones de personas, provoca 50,000 muertes anuales y existen 100 millones de personas en riesgo de adquirirla. La fase aguda pasa inadvertida y la carencia de fármacos capaces de eliminar los efectos nocivos del parásito, o vacunas que permitan prevenir una infección, hacen de esta enfermedad un problema de salud pública importante.

La enfermedad de Chagas se caracteriza por un curso clínico variable que varía desde casos asintomáticos hasta una enfermedad crónica severa, con desarrollo de problemas cardíacos y/o digestivos. Esta variabilidad se atribuye tanto a las diferencias en la respuesta del huésped como a la heterogeneidad del genoma del parásito. La variabilidad genética del *Trypanosoma cruzi* se ha analizado a nivel proteico, por medio de electroforesis de isoenzimas, así como a nivel del genoma total, por medio del uso de marcadores moleculares, como los microsatélites.

Los microsatélites representan una herramienta poderosa, en cuanto a caracterizar la estructura del genoma, ya que permiten el estudio de la diversidad a nivel del ADN nuclear; combinan especificidad y alta variabilidad; y son fácilmente amplificados por medio de reacciones en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos para la región de ADN que flanquea la secuencia repetitiva.

La baja tasa de polimorfismo observada en las muestras nacionales, al utilizar cebadores diseñados para microsatélites polimórficos en muestras de Brasil, hizo necesario el desarrollo de nuevos cebadores (Pamela Pennington, comunicación personal). La identificación y caracterización de otros microsatélites polimórficos permitió analizar permitió el análisis de muestras de *T. cruzi* aisladas de triatominos de regiones endémicas de Guatemala, con lo cual se caracterizó la estructura genética de estas poblaciones. Esta caracterización permitió hacer un perfil genético de las cepas aisladas de las heces de los triatominos. A futuro, este análisis permitirá la determinación de las diferencias entre cepas de *Trypanosoma cruzi* y el esclarecimiento de la relación entre cepa de parásito y forma patogénica observada en el paciente.

## II. ANTECEDENTES

### A. Enfermedad de Chagas

#### 1. Generalidades. La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana descubierta por

Carlos Chagas en 1909, es una afección parasitaria causada por el *Trypanosoma cruzi*, protozooario hemoflagelado transmitido a los seres humanos por medio de las heces de insectos hematófagos de la familia *Triatominae* infectados, de transfusiones de sangre de donadores infectados, por infección congénita, o, más frecuentemente, por transplantes de órganos, alimentos contaminados o accidentes de laboratorio. La enfermedad de Chagas se distribuye a lo largo del continente americano, desde el sur de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos (Macedo *et.al.*, 2002).

Las pérdidas económicas a lo largo del continente, debido a una mortalidad temprana y al impedimento que conlleva la enfermedad en la población activa, son equivalentes al 2.5% de la deuda externa de todo el continente en 1995. En la actualidad no existe ni vacuna para prevenir la enfermedad de Chagas ni fármaco para curar la infección una vez se observan síntomas clínicos (WHO, 2000).

#### 2. Agente infeccioso. El *Trypanosoma cruzi* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*,

suborden *Trypanosomatina* y orden *Kinetoplastida*. Los tripanosomas tienen los componentes celulares típicos de los eucariotas: núcleo, microtúbulos, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y una mitocondria. El cuerpo kinetoplástico situado en la base del flagelo, el cual corresponde al organelo mitocondrial, es el componente celular que unifica al orden Kinetoplastida., *vid* figura 1 (Campbell, 2002; INGEBI, 2003).

La transmisión vectorial ocurre cuando, inmediatamente después de succionar la sangre, el hematófago defeca (*vid* figura 2), liberando los parásitos en su forma de tripomastigote metacíclico (*vid* figura 3) en las heces contaminadas. El prurito causado por la picadura incita al huésped mamífero a facilitar el contacto de las heces contaminadas con herida, las mucosas bucales o la conjuntiva, provocando la infección. Los tripomastigotes metacíclicos invaden las células de varios tejidos, donde se diferencian a amastigotes (*vid* figura 3), los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria (cada 12 horas). Una proporción de los amastigotes se diferencia a tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados, junto con algunos amastigotes, durante la lisis celular del huésped. Los amastigotes liberados infectan nuevas células, mientras que los tripomastigotes reingresan al torrente sanguíneo y eventualmente serán ingeridos por los insectos *Reduviidae*, durante una picadura. Al llegar al intestino del insecto, los tripomastigotes se diferencian a dos formas replicativas: epimastigotes (*vid* figura 3) y esferomastigotes. Estos proliferan por

división celular y, al llegar al recto, se adhieren por medio del flagelo a la ampolla rectal. Es aquí donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, estadio infeccioso del parásito, completándose el ciclo de vida (vid figura 4) Dicha diferenciación es inducida por componentes de la orina, la cual es inyectada en el momento de la deyección. (Macedo *et al*, 2002; INGEBI, 2003).

Figura 1

Dibujo esquemático, basado en datos de microscopio electrónico, identificando estructuras del *Trypanosoma cruzi* en su estadio epimastigote.

(Adaptado de Wanderly, 1999)

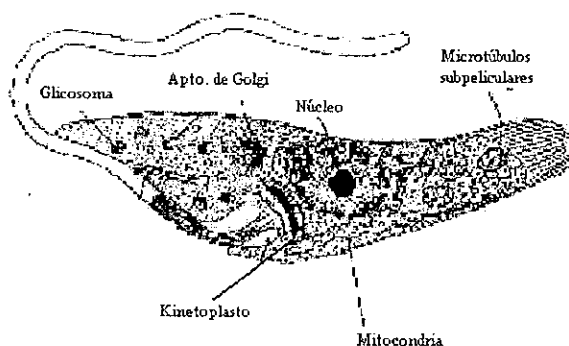
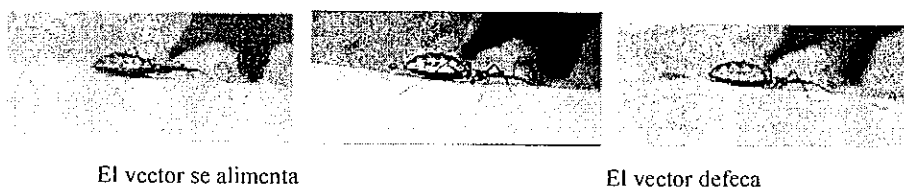


Figura 2

Vector de la enfermedad de Chagas en el proceso de defecar

(Blitzman, 2000)



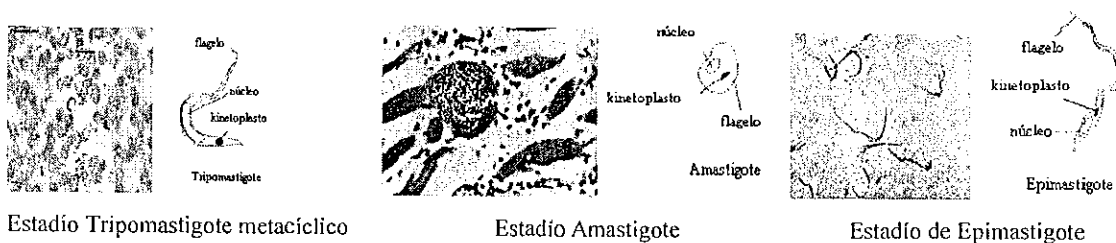
El vector se alimenta

El vector defeca

Figura 3

Formas de desarrollo del *Trypanosoma cruzi*

(Blitzman, 2000; Atlas de parasitología, 2003a y 2003b; Campbell, 2002)



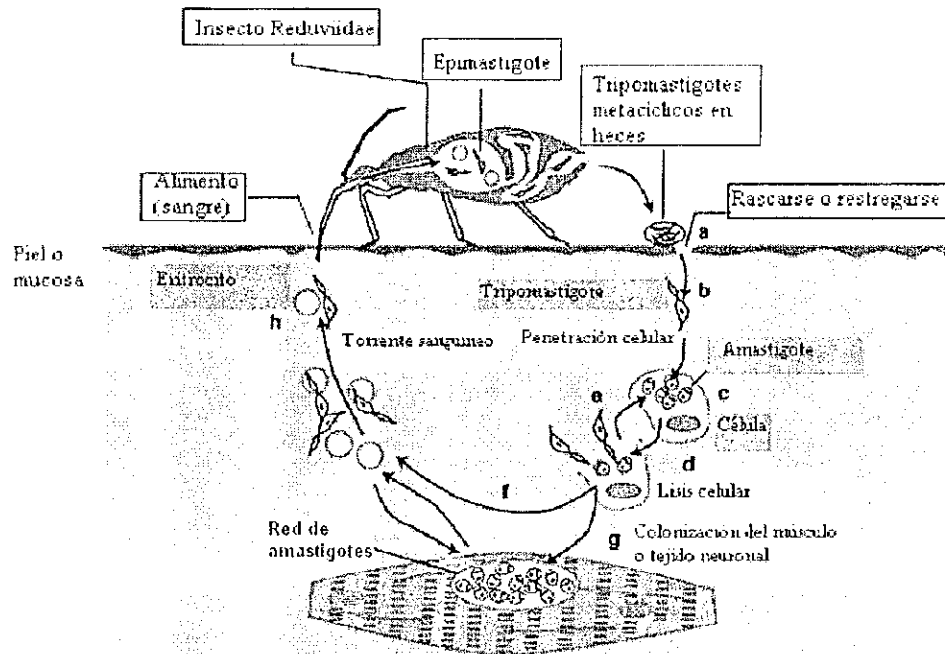
Estadio Tripomastigote metacíclico

Estadio Amastigote

Estadio de Epimastigote

Figura 4

Representación esquemática del ciclo de vida del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*  
(Adaptado de Macedo, 2002)



Durante la succión de sangre, el insecto defeca en la piel. (b) El protozoo en la heces, en la forma de tripomastigote metacíclico (15–25 micrones en longitud y dirigido por un flagelo largo unido a una membrana ondular), entra en el huésped mamífero (humano en esta figura) cuando se rasca la piel o se restriega las mucosas. (c) En el huésped mamífero, los tripomastigotes penetran células locales y se diferencian a amastigotes; estos tienen una forma redonda replicativa intracelular, 1.5–5 micrones en ancho y carentes de flagelo, los cuales se multiplican intracelularmente. Algunos amastigotes se diferencian de nuevo a tripomastigotes, provocan la lisis celular. (d) Una vez que la célula muere, los amastigotes y tripomastigotes son liberados e (e) infectan nuevas células, (f) reingresan al torrente sanguíneo o (g) colonizan tejido muscular o neuronal como mallas de amastigotes. (h) Los insectos *Reduviidae* son infectados cuando el insecto se alimenta de sangre que contiene tripomastigotes (alimento sangre). (i) En el intestino del insecto, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes; los cuales son formas replicativas intravectoriales de 20 micrones en longitud, con un flagelo largo y proliferan principalmente por reproducción asexual. Alcanzando el recto, estas formas se diferencian a los tripomastigotes metacíclicos infectivos, completándose el ciclo de vida.

### 3. Patogénesis. Después de la infección del parásito en los humanos, el período de

incubación es de 1-2 semanas. La enfermedad se manifiesta, la primera vez, por una fase corta y aguda, caracterizada por la presencia de gran cantidad de parásitos en el torrente sanguíneo, seguida de una fase crónica, con escasa parasitemia. La fase aguda generalmente ocurre en los niños; se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, cefalea, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía. Esta etapa puede ser desde asintomática, hasta grave o fatal. Es común encontrar una reacción inflamatoria local (chagoma), con crecimiento de los nódulos linfáticos regionales, así como edema unilateral de alguno de los párpados (signo de Romaña). Las manifestaciones que amenazan la vida

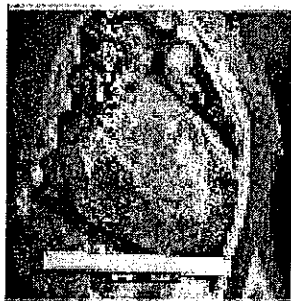
o que son mortales incluyen miocarditis y meningoencefalitis. En la fase indeterminada, el paciente se encuentra asintomático, pero si se le estudia adecuadamente se encontrarán datos sugerentes de miocarditis. Esta fase puede durar por tiempo indefinido o adoptar la forma crónica (Macedo, 2002; Ojeda y Murguía, 1998).

La enfermedad crónica está caracterizada por una sintomatología clínica variable; desde ausencia de síntomas hasta enfermedad severa, con problemas cardiovasculares o gastrointestinales. Las patologías cardíacas muestran una miocarditis crónica que termina, generalmente, en cardiomegalia, fallo cardíaco y arritmias. La forma digestiva de la enfermedad, que consiste en la dilatación del esófago y/o colón (megaesófago y/o megacolón, respectivamente) puede observarse en estados avanzados. Patológicamente, el corazón y el tracto digestivo muestran infiltrados linfocíticos, con escasez o pérdida de células del miocardio en la cardiopatía y degeneración neuronal, con denervación, en el megaesófago y megacolón (*vid* figura 5). En Brasil, la forma asintomática o indeterminada es la más común (60-70%), seguida de las formas cardíacas y digestivas (20-30% y 8-10%, respectivamente) y la forma cardio-digestiva es la más rara (Macedo, 2002).

No existe un tratamiento definitivo, inmunológico o medicamentoso. El tratamiento específico se debe establecer con rapidez en la fase aguda, con lo cual los síntomas mejoran y los tripanosomas desaparecen de la sangre periférica en cinco días. En los casos crónicos se logra la disminución de la parasitemia y revertir el xenodiagnóstico positivo (que consiste en hacer picar al paciente por los triatominos y descubrir los parásitos en las heces 45 a 60 días después de la ingestión de la sangre), pero no sucede lo mismo con la reacción serológica, que pocas veces se vuelve negativa. Son dos los medicamentos que se usan tradicionalmente: nifutimox y benzonidazol, éste último es el de mayor elección. El tratamiento no mejora la función cardíaca, las manifestaciones clínicas, ni la progresión de la enfermedad. El tratamiento sintomático de los pacientes incrementa su vida útil, basándose en diuréticos y antiarrítmicos, también son útiles los marcapasos de demanda y/o la cirugía para la sutura o resección de aneurismas cardíacos (Ojeda y Murguía, 1998).

Aún queda sin resolver la razón por la cual los pacientes desarrollan las formas cardíaca, digestiva, cardio-digestiva o indeterminada. Una posible explicación es la variación geográfica significativa en la prevalencia y severidad de las diferentes formas de la enfermedad. Por ejemplo, en Chile, la forma digestiva es la más frecuente, mientras que en Argentina ésta sólo corresponde al 3.5% del total de la enfermedad. Estudios epidemiológicos han mostrado una distribución variable de las formas clínicas, incluso dentro de las regiones endémicas. Se cree que esta heterogeneidad geográfica es provocada principalmente por la variación genética del *Trypanosoma cruzi*; ya que no existe una correlación clara con cualquier patrón de etnia o genética humana, o variación ambiental (Macedo, 2002).

Figura 5  
 Patología cardíaca y digestiva de la enfermedad de Chagas  
 (Campbell, 2003)



Cardiomegalia chagásica




Megacolon en la necropsia con aneurisma

#### 4. Epidemiología. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

indican que la enfermedad afecta entre 16-18 millones de personas, provoca 50,000 muertes anuales y existen 100 millones de personas en riesgo de adquirirla; cifra que representa aproximadamente el 25% de la población en América Latina. La enfermedad de Chagas se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de la Argentina, principalmente en las áreas rurales pobres de Centro y Sur América (*vid* figura 6). En el cuadro 1, se muestra la incidencia anual de la enfermedad de Chagas en Centroamérica. En el cuadro 2, se muestra los datos epidemiológicos y tratamientos para la enfermedad de Chagas (CDC, 2002a; CDC, 2002b; Ojeda y Murguía, 1998; WHO, 2000).

Figura 6  
 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas  
 (Adaptado de Seattle Biomedical Research Institute, 2002)



 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas

Cuadro 1

Situación de la infección por *Trypanosoma cruzi* en los países de Centroamérica  
(OPS, 1999)

PAÍS	Población en riesgo		Población estimada infectada			
	No. <sup>a</sup>	%Total de la población	No. <sup>b2</sup>	% Total de la población <sup>3</sup>	Tasa <sup>3</sup> (00,000)	Incidencia anual
Belice	-	-	675	0,35	357	116 <sup>4</sup> 265 <sup>5</sup>
Costa Rica	1.112	45	130	5,30	5.316	4.030 <sup>4</sup> 3.320 <sup>5</sup>
El Salvador	2.146	43	322	6,90	6.945	10.048 <sup>4</sup> 10.594 <sup>5</sup>
Guatemala	4.022	52	730	9,82	9.827	30.076 <sup>4</sup> 28.387 <sup>5</sup>
Honduras	1.824	42	300	7,41	7.446	9.891 <sup>4</sup> 11.490 <sup>5</sup>
Nicaragua	-	-	67	1,82	1.822	5.016 <sup>4</sup> 2.660 <sup>5</sup>
Panamá	898	42	220	10,60	10.643	7.130 <sup>4</sup> 5.346 <sup>5</sup>

a. en miles. b. Número total. 1: las cifras corresponden a los años 1980-1986 y se obtuvieron de :Weekly Epidemiol Rec 65:257-264, 1990 y TDR. Eight Program Report pp 89-98, 1987. Cuando las encuestas duraron más de un año, las tasas se obtuvieron considerando la media de la población de los años 1980-1985 obtenida de la Condiciones de Salud de la Américas. OPS Pub Sci No. 539, Vol 1, pp 41-42, 1994. 2: Schodfield, J. Díaz JCP. Proc. Int Workshop on population genetics and control of *Triatominae*. Ecuador pp 11-16, 1995. 3: La población total para los cálculos se obtuvo de Condiciones de Salud de las Américas, OPS, Pub Sci No. 539, Vol 1, pp 41-42, 1994. 4: Hayes, RJ, Schofield J. Bol Ofic Sanit Panam 108:308-316, 1990. 5: Schofield J, Dujardin, JP. Parasitol Today 13:141-144, 1997.

Cuadro 2

Datos epidemiológicos y tratamientos para la enfermedad Chagas  
(Adaptado de Structural genomics of pathogenic protozoa, 2003)

<b>Organismo</b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>En riesgo</b>	100 millones – América Central y Sudamérica
<b>Seres humanos infectados</b>	16-18 millones
<b>Resultados de la enfermedad</b>	10-30% muere por complicaciones después de décadas de infección
<b>Vacunas en desarrollo</b>	Pobre, debido a la variabilidad genética
<b>Fármacos disponibles</b>	Sólo 1 – tóxico e ineficaz-
<b>Resistencia a fármacos</b>	Se sospecha

En condiciones naturales, el flagelado *Trypanosoma cruzi* infecta a más de 100 especies de mamíferos de distintos órdenes. Originalmente la enfermedad era una “zoonosis” que recientemente se extendió a humanos. El medio de transmisión más común entre los huéspedes vertebrados es por medio de triatomíneos del orden Hemiptera y familia Reduviidae, tales como *Triatoma*, *Rhodnius* y *Pastronylus*; los cuales tienen el parásito en su intestino. En general, la presencia de insectos *Triatominae* es una indicación de una transmisión activa del *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, también existen casos de infección por transfusiones de sangre contaminada, trasplantes de órganos o traspaso de madre a hijo (Campbell, 2002; Macedo *et al*, 2002).

El parásito existe en tres diferentes ciclos: el domiciliar, el peri domiciliar y el selvático. El ciclo selvático involucra pequeños mamíferos salvajes, tales como los armadillos, marsupiales del género *Didelphis* y varias especies de roedores que viven en contacto cercano con una o más especies de triatomíneos (no adaptados a los hábitats domiciliarios), los que transmiten el parásito de un animal al otro. La transmisión a huéspedes salvajes ocurre ya sea vía las heces contaminadas del triatomíneo, o por ingestión de los triatomíneos infectados. La especie *Rhodnius prolixus* está asociada al ciclo de transmisión selvático. Al irse internando en la selva, los seres humanos se convirtieron, junto con los animales domésticos, en nuevas fuentes de sangre para los triatomíneos salvajes. La transmisión del *Trypanosoma cruzi* a los seres humanos y sus animales domésticos, por especies de triatomíneos salvajes, constituye el ciclo peri domiciliar, el cual resultó de especies salvajes que utilizaron las fuentes de sangre en los hábitats domiciliarios y peri domiciliarios. Los armadillos y los marsupiales del género *Didelphis* juegan un rol importante en la unión de los ciclos selvático y doméstico; ellos están infectados toda su vida e infectan triatomíneos que invaden casas o infectan animales domésticos (*vid* figura 6). Eventualmente, las especies salvajes se han adaptado a vivir cerca de los seres humanos. Las paredes de barro, los techos de hoja de palmera o de paja, los catres, las rajaduras en las paredes de adobe, los gallineros y otro tipo de microhábitats ofrecen condiciones ideales para la colonización del vector. La transmisión del *Trypanosoma cruzi* entre triatomíneos adaptados a los hábitats domésticos, seres humanos y animales domésticos constituye el ciclo domiciliar. El principal reservorio para las infecciones humanas son los perros y gatos domésticos. La especie *Triatoma infestans* es responsable de este ciclo de transmisión en el Cono Sur (Campbell, 2002; Grijalva, 2002).

**5. Vectores.** Existen más de 90 especies reconocidas de *Triatominae*, de las cuales 9/10 están restringidos a América y el Caribe (*vid* distribución en figura 8). La mayoría de éstos están infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los vectores domésticos más importantes de *T. cruzi*, tales como *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. maculata* y *T. infestans* tienen una distribución más allá de sus ecotopos de sus ecotopos silvestres. Los principales ecotopos silvestres de estas especies son identificados como nidos de marsupiales, especialmente *Didelphys*, para *P. megistus*, y áreas rocosas colonizadas por roedores tales como el mocó (*Cerodon rupestris*) para *T. brasiliensis* y *T. maculata*. El ecotopo silvestre de

*T. infestans* en el sur de Brasil puede ser una adaptación secundaria de focos domésticos de infección y el ecotopo principal puede estar representado por cuevas de roedores inhabitadas. Existe evidencia que estas especies han migrado, de manera autónoma y ayudada por el hombre, de zonas de transición silvestres/domésticas: *P. megistus* hacia el norte, *T. brasiliensis* y *T. maculata* hacia el sureste y *T. infestans* hacia el noreste. La migración de especies domésticas es un fenómeno continuo (Martins, 1976).

Figura 7

El ciclo de transmisión natural del *Trypanosoma cruzi*  
(Adaptado de Campbell, 2003)

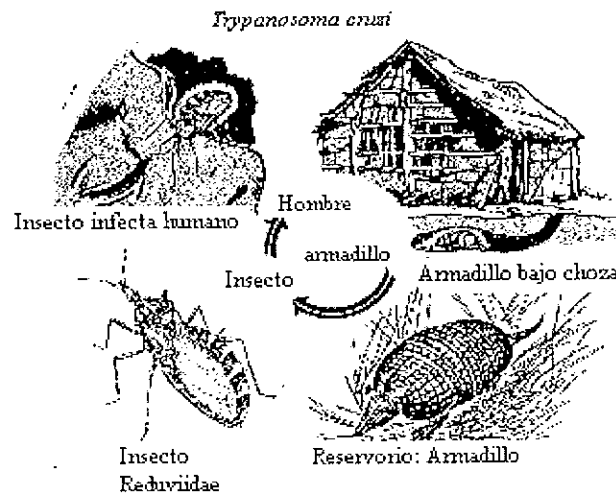
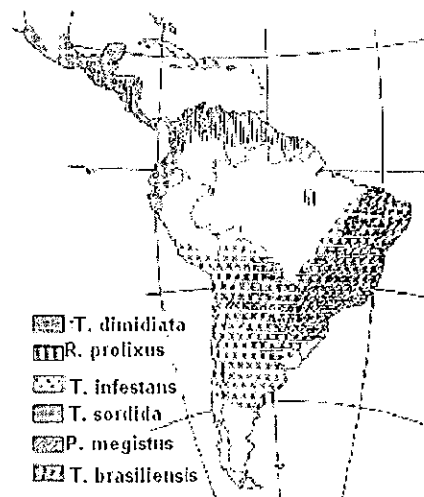


Figura 8

Distribución geográfica de los principales vectores triatominos  
(Oswaldo Cruz Institute, 2002b)



En los países del Cono Sur (Argentina, Brasil y Chile), los vectores domésticos más importantes de *T. cruzi*, tales como *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. maculata* y *T. infestans*, tienen una distribución más allá de sus ecotopos silvestres. Los principales ecotopos silvestres de estas especies son identificados como nidos de marsupiales, especialmente *Didelphys*, para *P. megistus*, y áreas rocosas colonizadas por roedores tales como el mocó (*Cerodon rupestris*) para *T. brasiliensis* y *T. maculata*. El ecotopo silvestre de *T. infestans* en el sur de Brasil puede ser una adaptación secundaria de focos domésticos de infección y el ecotopo principal puede estar representado por cuevas de roedores inhabitadas. Existe evidencia que estas especies han migrado, de manera autónoma y ayudada por el hombre, de zonas de transición silvestres/domésticas: *P. megistus* hacia el norte, *T. brasiliensis* y *T. maculata* hacia el sureste y *T. infestans* hacia el noreste. La migración de especies domésticas es un fenómeno continuo. No existe una relación aparente entre el tipo de hábitat silvestre y la pregunta acerca de una especie que colonice casas. Todos los hábitats silvestres principales están representados por especies domésticas: *P. megistus* desde los nidos de marsupiales y otros mamíferos, *R. prolixus* y *T. sordida* de las palmas con pájaros y mamíferos, *T. brasiliensis* y *T. maculata* desde áreas rocosas con roedores y *T. patagonica* desde arbustos. La localización dentro de las casas de hoja de palma o techos de teja, o barro o paredes de piedras pueden, en algunos casos, reflejar el hábitat silvestre. Algunas especies se siguen adaptando a los nichos domésticos, como se ha visto en la asociación peridomiliar de *T. sordida* con gallinas. Las características de las especies domésticas más exitosas pueden predecirse por una falta de especificidad de huésped, una tasa alta de crecimiento natural, poderes eficientes de dispersión autónoma o adaptación en reservorios y pocas restricciones climáticas o de microhábitat. La escasez de especificidad de huésped puede observarse en *P. megistus*, *R. pallescens*, *R. prolixus*, y *T. dimidiata* selváticos (Martins, 1976).

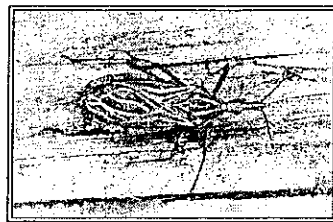
En Centro América, las especies *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (vid figura 9) son los principales vectores de la enfermedad de Chagas. La especie *R. prolixus* prefiere habitar los techos de paja de chozas y siempre pega sus huevos a un sustrato. La especie *T. dimidiata* tiende a situarse principalmente en las paredes de las habitaciones de casas con bajas condiciones sanitarias, en general a una altura no mayor a dos metros por encima del piso; pero también se encuentra detrás de cuadros, en adornos colgados o en objetos acumulados de distintos tipos. Estos insectos también están asociados con casas cuyos pisos son de tierra, en los cuales las ninfas se pueden camuflajear al cubrir sus cuerpos con residuos presentes en el suelo. En los alrededores de las casas, estos insectos se esconden en cualquier tipo de objetos guardados, en particular en los leños apilados o en los gallineros (Tacano and Edman, 2001; Zeledón *et al.*, 2001).

Estudios poblacionales han mostrado que la especie *T. dimidiata* tiene una amplia distribución en Centro América y se han encontrado focos tanto silvestres como domésticos; por lo que su control presenta un mayor reto. Por su lado, la especie *Rhodnius prolixus* está totalmente domiciliada en la región centroamericana y representa una población clonal. Esta especie ha sido reportada como la que sostiene la

mayor tasa de transmisión a humanos. Programas de control del vector en el Cono Sur, donde el vector principal de la enfermedad de Chagas es *T. infestans*, han mostrado eficacia. Sin embargo, las tasas de reinfestación en las casas fumigadas se encuentran entre el 3 y el 88%, hasta 7 años después del tratamiento. Un estudio preliminar en Guatemala, en cuanto a la efectividad del tratamiento al fumigar las casas infectadas con insecticida, indicó la eliminación de la especie *R. prolixus* hasta un año después mientras que *T. dimidiata* pudo reinfestar las casa fumigadas antes de un año, posiblemente debido a la existencia de un foco silvestre (Anderson *et al.*, 2002; Cordón Rosales, 2002; Montenegro, 1943; Schofield, 1994)

Figura 9

Vectores principales de la enfermedad de Chagas  
(Ohio State University, 2002; Dumonteil, 2000)



*Rhodnius prolixus*



*Triatoma dimidiata*.

## B. Genética molecular

1. Organización del genoma. El genoma del *Trypanosoma cruzi* está organizado en aproximadamente 20-25 bandas cromosómicas que varían de 0.3 a 1.6Mb; usualmente con cromosomas mayores que 1.6Mb. El contenido de ácido desoxiribonucleico (ADN) total y nuclear varía considerablemente entre diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, entre clones de la misma cepa, e incluso entre cromosomas homólogos (Agüero *et al.*, 2000; Fonseca y Romanha, 2002).

Por medio de una secuenciación al azar del genoma total del *Trypanosoma cruzi* se determinó que el contenido total del dinucleótido guanina-citosina (GC) representa aproximadamente el 50.9% y que la cadena de adeninas ( $A_n$ ) y de timinas ( $T_n$ ) en forma de di- y trinucleótidos posee una frecuencia mayor que la observada para el dinucleótido CA, el más común en vertebrados. Por medio de una búsqueda en la base de datos de secuencias se identificó que la familia más grande corresponde a la superfamilia de los antígenos del *Trypanosoma cruzi*, más conocida como las moléculas similares a las transialidasas, involucradas en su mayoría en las interacciones huésped/parásito. Otras secuencias que conforman grandes familias de genes en *Trypanosoma cruzi* son las de la *cruzipain cistein* proteínasa, una proteína grande con función desconocida, y las mucinas del parásito (*vid* cuadro 3). También se detectaron secuencias que

codifican para genes aún no caracterizados. Al buscar repeticiones simples, de 1-6 pares de bases, se identificó que las secuencias altamente repetitivas más abundantes en *Trypanosoma cruzi* son cadenas de timina (T)<sub>n</sub> y su complementario, siguiéndole las cadenas del dinucleótido timina-adenina (TA)<sub>n</sub> y del trinucleótido timina-adenina-adenina (TAA)<sub>n</sub> (vid figura 10). Las regiones de baja complejidad son ricas en el dinucleótido adenina-timina (AT) y en los nucleótidos timina (T) y adenina (A), que en conjunto representan más del 85%. Como se muestra en el cuadro 3, el elemento más abundante en el genoma del *Trypanosoma cruzi* es el elemento repetitivo minicromosomal de 195 pares de bases. También se identificaron secuencias altamente repetitivas, asociadas a los telómeros y al gene *spliced leader* (Agüero *et al.*, 2000).

Cuadro 3  
Grandes familias de genes en el *Trypanosoma cruzi*  
(Adaptado de Agüero *et al.*, 2000)

A. Familia de genes	No. de *GSSs	No. de Copias estimadas
Dgf-1	494	154
Trans-sialidase	427	632
L1 non-LTR retrotransposon	214	149
Mucin	122	710
Cistein proteinasa (Cruzipain)	39	91
ORF predecible (gi3053534), cromosoma 3	38	103
gp63	34	70
Histona H4	29	337
Homologo a la Casein quinasa	23	81
Adenilil ciclase	19	18
Hsp70	18	25
Histona H2A	17	145
Helicasa	14	24
Hsp90	11	18
<b>Total</b>	<b>1499</b>	

B. Familias de ADN repetitivo	No. De GSSs	No.de Copias estimadas
Repetición minicromosomal de 195pb	854	15287
TelIRE (I)	266	1664
VIPER	174	257
C6 elemento interdisperso	230	560
SIRE	201	3011
Secuencias asociadas a los telómeros	131	1963
TelIRE (II)	47	2310
TRBSEQA	31	105
HCR6	10	57
Spliced Leader gen	12	69
<b>Total</b>	<b>2133</b>	

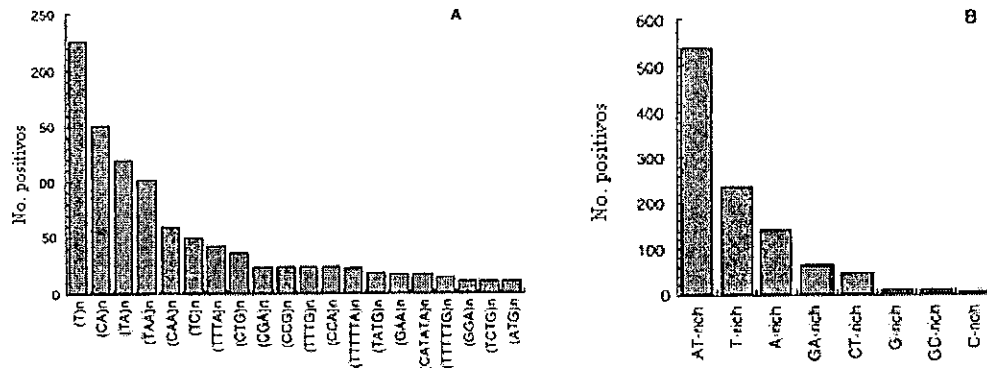
C. Familias desconocidas	No. De GSSs	No.de Copias estimadas
Cluster 2009	19	54
Cluster 2047	85	136
Cluster 2015	53	96
Cluster 1994	25	82
Cluster 2056	22	30
Cluster 2019	21	102
Cluster 2027	12	58
Cluster 1986	10	48
Total	247	

\*Examen de las secuencias del genoma o GSS por sus siglas en inglés de Genome Sequence Survey.

(A) Familia de genes (codifican para proteína). (B) Familia de ADN repetitivo (probablemente no codifican). (C) Secuencias no caracterizadas. Información acerca de las familias de genes desconocidos (secuencia consenso como GSS's individuales pueden encontrarse en la siguiente dirección <http://www.itb.unsam.edu.ar/genomelab/teruzzi/gss.html>.

Figura 10

Repeticiones de microsatélites y regiones de baja complejidad en el genoma del  
*Trypanosoma cruzi*  
(Adaptado de Agüero *et al.*, 2000)



Se buscaron en la base de datos de GSS de *Trypanosoma cruzi* repeticiones simples y regiones de baja complejidad utilizando el programa REPEATMASKER (A) Los 20 microsatélites más abundantes. El valor mínimo para  $n$  es el dado por el puntaje de Smith-Waterman (SW)  $\geq 180$ , que es el límite para ser considerado como positivo. Cada microsatélite en la gráfica incluye todas las combinaciones, en consecuencia (A) $n$  también incluye su complemento (T) $n$ , y (ATG) $n$  también incluye (CAT) $n$ , (ATC) $n$ , (TCA) $n$ , (TGA) $n$  y (GAT) $n$ . (B) Regiones de baja complejidad. El largo de las regiones detectadas varió de 16 pb a 308 pb.

## 2. Métodos de detección de diversidad genética

a. Electroforesis de isoenzimas. La electroforesis de isoenzimas consiste en el análisis de los perfiles bioquímicos de extractos del parásito. Estos últimos se someten a una electroforesis de enzimas celulares o isoenzimas en geles de almidón o placas de acetato de celulosa y a una tinción bioquímica con sustratos colorimétricos o fluorescentes específicos para las distintas

enzimas. El análisis de las isoenzimas en extractos de *T. cruzi* representa el primer método experimental que demostró la extensa diversidad genética del parásito (Macedo *et. al.*, 2002).

Desgraciadamente, existen suposiciones que limitan esta técnica. Por un lado, en un locus dado, la electroforesis de isoenzimas revela únicamente una porción de la variabilidad genética real. Además, los patrones de descendencia y ancestralidad entre los diferentes alelos son imposibles de definir. Debido a estas dos razones, el análisis de isoenzimas no puede revelar relaciones históricas entre los alelos en sí. Sin embargo, cuando lo único que se quiera conocer es la frecuencia alélica, para determinar la estructura geográfica, la electroforesis de isoenzimas es ideal. Sin embargo, los cultivos de *T. cruzi* están generalmente contaminados con hongo, lo cual puede inducir cierto error en los resultados, ya que no se puede diferenciar las proteínas del parásito de las del hongo (Roderick, 1996; Comunicación personal Pamela Pennington).

En Brasil Miles, *et al.* (1978), propusieron la existencia de tres grupos isoenzimáticos, o zimodemos, Z1, Z2 y Z3, basándose en el estudio de la variabilidad de seis diferentes loci del *T. cruzi*. Estudios epidemiológicos en Brasil demostraron que los zimodemos Z1 y Z3 están asociados principalmente al ciclo de transmisión silvestre mientras que el Z2 lo está con el ciclo de transmisión doméstica. En Centro América, Venezuela, Colombia y México el *T. cruzi* Z1 es el agente más común mientras que el tipo Z2 no se ha detectado. Además, se cree que la especificidad epidemiológica varía de acuerdo de la región ya que en Centro América y México el *T. cruzi* del tipo Z1 está asociado al ciclo doméstico y silvestre (Vallejo *et al.*, 2000; Comunicación personal Pamela Pennington, 2003). Posteriormente, Tibayrenc, *et al.*, utilizando quince loci, demostraron una mayor diversidad genética y 43 genotipos fueron propuestos. El análisis taxonómico numérico de estos resultados sugirió la existencia de dos principales y altamente heterogéneos linajes filogenéticos del *T. cruzi* que difieren en varias propiedades biológicas: linaje 1 y linaje 2. El linaje 2 puede subdividirse en cinco grupos génicos de menor importancia (2a-e) (Barnabe, *et al.*, 2000).

b. ADN polimórfico amplificado al azar “Randomly Amplified Polymorphic DNA”, RAPD’s, por sus siglas en inglés. La técnica de ADN polimórfico amplificado al azar, o RAPD, se basa en la amplificación al azar de secciones de ADN nuclear utilizando un único cebador de 8-10 pares de bases cuya secuencia es arbitraria. Los productos se visualizan en un gel que separa del fragmento de ADN particular amplificado dependiendo de su tamaño. Se construye un árbol basado en la similaridad de frecuencias alélicas para reflejar los fragmentos de ADN compartidos entre poblaciones (Macedo *et. al.*, 2002; Roderick, 1996).

La técnica de RAPD contiene dos limitantes intrínsecas. Primero, las amplificaciones del ADN constituyen los datos finales, obteniéndose así una variación experimental alta, especialmente cuando la

temperatura de hibridación utilizada es baja. Segundo, debido a la **codominancia** de las bandas, no se puede diferenciar entre **heterocigotos** u **homocigotos** (Roderick, 1996).

La interpretación de los RAPD's está limitada por su baja repetibilidad, carencia de codominancia y por la posibilidad de observar elementos no heredables o no-homólogos; un problema compartido con las técnicas de electroforesis de isoenzimas y **polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP)**. Además, la poca especificidad del cebador no provee la misma resolución que el análisis de los esquizodemos o la huella digital de ADN (Macedo *et. al.*, 2002; Roderick, 1996).

Cuando los RAPD's fueron utilizados en el estudio de las diferentes cepas de *T. cruzi*, se encontró una correlación con los resultados de la electroforesis de isoenzimas. Recientemente, los perfiles de los RAPD's fueron utilizados para corroborar la división del *T. cruzi* en dos linajes principales. Aunque se critique la repetibilidad de esta técnica, los patrones observados en el estudio del *T. cruzi* probaron ser estables, incluso después de un cultivo prolongado de un clon del parásito de hasta 100 generaciones; indicando que bajo condiciones estrictamente controladas los RAPD's pueden tener una buena repetibilidad (Macedo *et. al.*, 2002).

c. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN kinetoplástico “Restriction fragment Length Polymorphism of Kinetoplastid DNA”, RFLP de kADN, por sus siglas en inglés. En la técnica del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN nuclear, los fragmentos de ADN amplificados por medio de una reacción en cadena de la polimerasa son digeridos con **enzimas de restricción**, las cuales cortan el ADN en secuencias específicas de cuatro o seis bases. Las sustituciones, inserciones o eliminaciones de bases en el ADN de cada individuo crean o eliminan sitios de corte de la enzima en estudio, alterando así el número y el tamaño de los fragmentos detectados y generando un polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN o RFLP por sus siglas en inglés *restriction fragment length polymorphism* (Roderick, 1996; Dowling, 1996).

Los parásitos del orden Kinetoplastidae, como el *Trypanosoma cruzi*, poseen un cinetoplasto que contiene ADN (kADN) compuesto de una serie de maxicírculos (moléculas de ADN circular homogéneo), y minicírculos (ADN circular heterogéneo que puede ser dividido en clase de secuencia, cuyo número y tipo puede diferir entre especies). El uso de este ADN en la técnica de RFLP dio lugar al RFLP del kDNA. Las poblaciones de parásitos que generan patrones de restricción del kDNA similar o idéntico son llamadas esquizodemos. Los análisis de kDNA RFLP identificaron un alto nivel de diversidad genética inesperada. Junto con los experimentos de clonación, esta técnica demostró por primera vez que una cepa de *T. cruzi* podía contener dos o más genotipos clonales distintos. Los esquizodemos presentaron cierta correlación con la clasificación determinada por la electroforesis de isoenzimas. Estos análisis son limitados debido al

monitoreo parcial del genoma, ya que los sitios de restricción no son homogéneos en la totalidad del genoma (Macedo *et. al.*, 2002).

d. Secuencias únicas: microsatélites.

1) Definición. Los microsatélites son una clase de marcadores moleculares que consisten en repeticiones consecutivas de secuencias de ADN genómico cortas. El número de repeticiones de éstos varía de 2-6 pares de bases de largo y poseen un tamaño mínimo de 8 nucleótidos. Estas secuencias son también llamadas repeticiones cortas consecutivas (STR por sus siglas en inglés *short tandem repeats*) o repeticiones de secuencias simples (SSR por sus siglas en inglés *simple sequence repeats*). Los microsatélites han sido detectados en los genomas de todos los organismos analizados hasta ahora, aunque el tamaño y densidad varía dependiendo de la especie. Generalmente, estas secuencias se encuentran principalmente en las regiones del genoma que no codifican, aunque pueden encontrarse en aquellas que sí lo hacen. La alta tasa de polimorfismo, la distribución homogénea a lo largo del genoma y la codominancia han clasificado a los microsatélites como unos marcadores moleculares excelente. En el cuadro 4 se comparan los microsatélites con otros marcadores moleculares (Chambers, MacAvoy, 2000; Dowling, 1996).

Cuadro 4

Comparación de características de tres marcadores moleculares:

Isoenzimas, RAPD's y Microsatélites

(Adaptado de Jame and Lagoda, 1996)

Característica	Isoenzimas	RAPD's	Microsatélites
Codominancia	Sí	No	Sí
Neutralidad	Dudosa	Sí	Sí
Fase de detección			
Embrión / Joven	Raro	Sí	Sí
Adulto	Sí	Sí	Sí
No. De locus variables analizados	10-50	10-100	5-20
No. alelos por locus	1-5	2	1-50
Información molecular (estructura, mutaciones)	Raro	Raro	Disponible
Costo relativo por individuo (sin escalas)	1	1	3-4

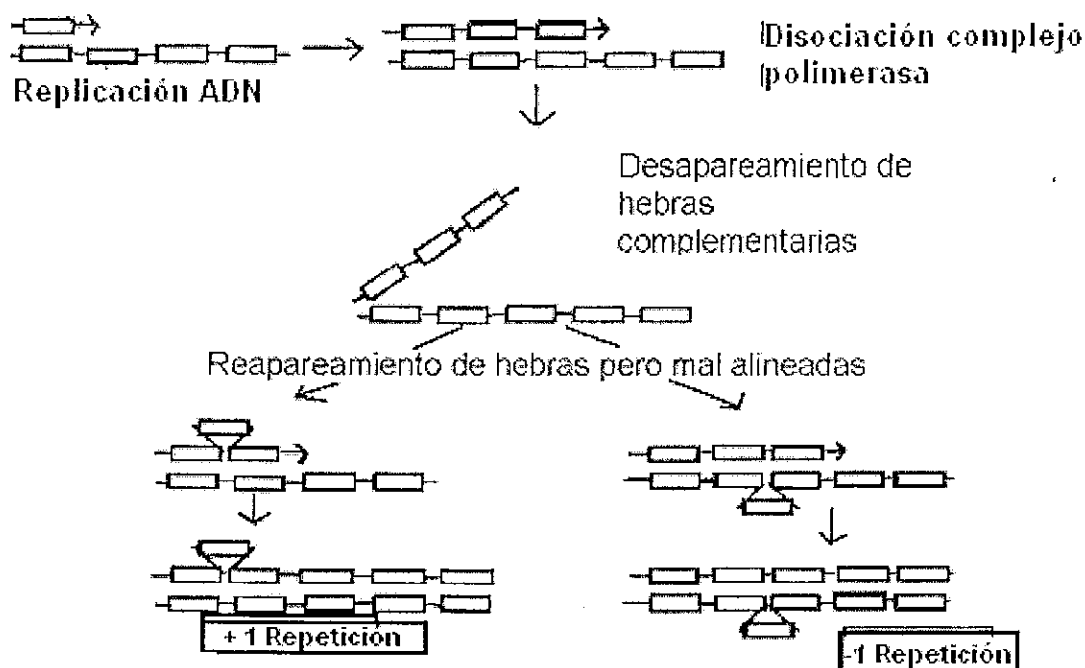
2) Biología. Los microsatélites se originan de regiones de simplicidad críptica, es decir de regiones en las cuales existen repeticiones de secuencias mezcladas que muestran cierto arreglo consecutivo (por ejemplo (GT)-AT-(GT)<sub>3</sub>). A partir de estas regiones, los microsatélites pueden crecer o disminuir, dependiendo del tipo de mutación (inserción o delección), de acuerdo a dos mecanismos principales: replicación con desapareamiento de hebra por corrimiento durante la replicación (*slipped-strand mispairing*) (vid figura 11) o por recombinación entre moléculas de ADN. Ambos mecanismos permiten la alta tasa de mutación de los microsatélites: 10<sup>-2</sup> en *E. coli*, entre 10<sup>-4</sup>

y  $10^{-5}$  en levaduras y alrededor de  $10^{-3}$  eventos por locus por generación en humanos (Goldstein and Schlötterer, 1999; Chambers, MacAvoy, 2000).

Los microsatélites se pueden dividir en seis clases dependiendo de cómo sea el motivo de repetición. Estas secuencias simples pueden ser puras o perfectas, puras interrumpidas, compuestas, compuestas interrumpidas, complejas y complejas interrumpidas (*vid* cuadro 5 para ejemplos). Sin embargo, la mayoría de investigadores se enfocan en aquellas repeticiones puras o perfectas que contengan diez o más unidades repetitivas. Se ha encontrado que las repeticiones imperfectas generalmente son menos polimórficas que las repeticiones perfectas. Por otro lado, se recomienda trabajar con tri- o tetranucleótidos para evitar la formación de bandas extras (*stutter bands*) que son muy comunes en las repeticiones compuestas de dinucleótidos; aunque se debe considerar que éstos últimos son más frecuentes en el genoma que los tri- y tetranucleótidos (Goldstein and Schlötterer, 1999; Chambers, MacAvoy, 2000).

Figura 11

Modelo de mutación de los microsatélites: desapareamiento de hebra por corrimiento  
(*slipped-strand mispairing*)  
(Adaptado de Goldstein and Schlötterer, 1999)



Cuadro 5  
Ejemplos de las seis clases de microsatélites  
(Adaptado de Chambers and MacAvoy, 2000)

Clase de microsatélite	Ejemplo de microsatélite
Pura o perfecta	- (CA) <sub>14</sub> -
Pura interrumpida	-TA-(CA) <sub>4</sub> -TA-(CA) <sub>7</sub>
Compuesta	-(CT) <sub>22</sub> -(CA) <sub>6</sub> -
Compuesta interrumpida	-(AC) <sub>14</sub> -AG-AA-(AG) <sub>12</sub>
Compleja	(TTTC) <sub>3</sub> -(T) <sub>6</sub> -(CT) <sub>10</sub> -(CYKY) <sub>n</sub> -CTCC-(TTCC) <sub>24</sub>
Complejas interrumpidas	Algunas secuencias complejas, con interrupción(es) dentro de la(s) unidad(es) repetitivas

3) Aplicación. El desarrollo de microsatélites como marcadores moleculares ha provocado la generación de una serie de aplicaciones que varían, desde la estimación de relaciones espaciales entre segmentos de cromosomas, hasta la elucidación de relaciones temporales entre orígenes de especies y género. La base de esta versatilidad se basa en los altos niveles de variabilidad y la rapidez y confianza con las cuales se pueden obtener resultados en el laboratorio. La hipervariabilidad de los loci de los microsatélites ha generado el desarrollo de tecnologías, llamadas comúnmente perfiles de ADN, las cuales permiten la identificación de individuos a nivel molecular. Esta técnica está siendo aplicada en el área forense. Por otro lado, la heredabilidad codominante de este marcador ha sido aplicada en el estudio de parentesco y en el análisis de pedigríes (Goldstein and Schlötterer, 1999; Chambers, MacAvoy, 2000).

Sin embargo, el análisis de microsatélites presenta problemas. En primer lugar, se encuentra el fenómeno de la **homoplusia**, en el cual se infiere que la identidad de estado (alelos de tamaños idénticos) es igual que la identidad por descendencia (misma estructura y misma historia genética). Tales parejas han sido nombradas electromorfos. La homoplusia provoca una sobreestimación de la relación entre dos poblaciones o muestras de estudio, por lo que la secuenciación de los productos amplificados sería la única solución para evitar este problema. Por otro lado es posible que la región que flanquea el microsatélite sufra una mutación, impidiendo así la unión del cebador y por consiguiente la no amplificación del locus correspondiente. Este es llamado alelo nulo y provoca la subestimación de heterocigocidad real (Chambers and MacAvoy, 2000).

### C. Estudios en microsatélites polimórficos identificados en *Trypanosoma cruzi*

A pesar de la gran variabilidad clínica de la enfermedad de Chagas, estudios basados en RAPD's han indicado una clara división del *Trypanosoma cruzi* en dos linajes principales con una alta divergencia

filogenética entre sí. Esta división ha sido oficialmente reconocida y los linajes se han denominado *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Estos dos grupos representan seguramente subespecies. Sin embargo, esta división siguió presentando cierto debate, por lo que se inició el estudio de la diversidad genética del parásito utilizando como marcadores moleculares a los microsatélites (Macedo *et al.*, 2001).

El análisis de ocho microsatélites polimórficos amplificados en 30 aislados de *T. cruzi* provenientes de *T. infestans*, humanos y mamíferos reservorios; recolectados en tres Estados de Brasil y tipificados como pertenecientes al linaje 1, 2 o 1/2 mediante el ARN ribosomal, correspondiendo a los tipos IIb, I y IIc respectivamente (Brisse, *et al.*, 2001), permitió establecer las siguientes evidencias: La presencia de patrones de uno o dos picos en el interferograma en distintos locus apoya la noción de diploidía del genoma del *T. cruzi*. La drástica desviación de la regla de Hardy-Weinberg y el fuerte desequilibrio de relación (*linkage disequilibrium*) sugieren que la reproducción sexual es rara o inexistente y que la estructura de la población es clonal, como fue propuesto anteriormente por el estudio de las isoenzimas. La presencia de más de dos bandas en un microsatélite se debe a la presencia de cepas multiclonales. El uso de microsatélites como marcadores moleculares permitió observar una alta diversidad genética en el parásito (Oliveira, *et al.*, 1998).

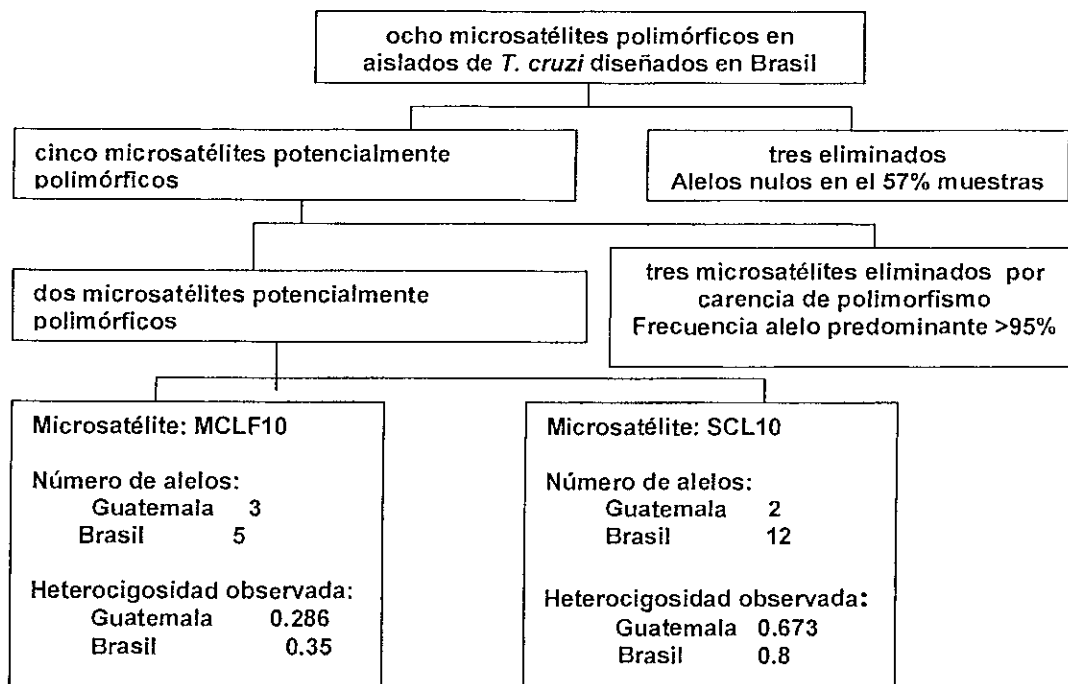
Sin embargo, Gaunt, *et al.* (2003), analizando seis clones obtenidos de dos aislados de *T. cruzi* del tipo I, contradicen algunas de las suposiciones descritas en el párrafo anterior. Por un lado, la presencia de más de dos alelos se explica por la presencia de una **poliploidía** en ciertas regiones del ADN del parásito. Por otro lado, la estructura clonal y la carencia de una reproducción sexual del parásito se pone en duda ya que se expone la posibilidad de una fusión de genotipos parentales y la pérdida de alelos (Gaunt, *et al.*, 2003).

En Guatemala, se realizó la amplificación de los ocho microsatélites diseñados en Brasil en muestras de *T. cruzi* aislados del vector *T. dimidiata*. Sin embargo, la alta frecuencia de alelos nulos; la carencia de polimorfismo en tres loci y el bajo grado de polimorfismo en los dos microsatélites restantes indicó la necesidad de diseñar microsatélites específicos para los aislados de *T. cruzi* de Guatemala, (*vid* cuadro 6) (Comunicación personal Pamela Pennington).

Cuadro 6

Análisis de polimorfismo de microsatélites diseñados en Brasil con muestras de aislados  
provenientes de Guatemala

(Pamela Pennington, datos no publicados)



## D. Genética de poblaciones

1. Frecuencia alélica en las poblaciones. Una medida de variación genética en las poblaciones es la frecuencia alélica en cada locus. La frecuencia de cualquier alelo en una muestra es igual al doble del número de homocigotos para ese alelo (porque cada homocigoto posee dos copias del alelo), más el número de heterocigotos para ese alelo (porque cada heterocigoto tiene sólo una copia); dividido por el doble del número de individuos en la muestra (porque cada individuo tiene dos alelos en ese locus). En otras palabras, para determinar la frecuencia alélica se cuenta el número de veces que aparece cada alelo en la población y se divide por el número total de alelos muestreados (Hartl, 1998; Tabashnik and Black, 1996).

$$\text{Frecuencia alélica} = \frac{(2 * \text{Homocigoto}) + \text{Heterocigoto}}{(2 * N)} \quad (1)$$

Donde, Homocigoto es el número de homocigotos para el alelo en estudio  
Heterocigoto es el número de heterocigotos para el alelo en estudio  
N es el número de muestras en estudio, en caso de tener un organismo diploide

2. **Equilibrio en una población.** Hardy y Weinberg propusieron una ley de equilibrio de los genotipos en una población, la cual tiene ciertas suposiciones; en una población grande, con reproducción al azar y ausencia de selección, migración y mutación, las frecuencias de genes y genotipos permanecen constantes de generación en generación (Tabashnik and Black, 1996).

Para determinar si una población está en **equilibrio de Hardy-Weinberg** se hace un muestreo con un número de individuos y se estima las **frecuencias genotípicas** y alélicas. Los números observados y esperados se comparan usando una prueba no paramétrica como Chi cuadrado ( $X^2$ ), calculando los grados de libertad como  $n(n-1)/2$  donde  $n$  es el número de alelos. Para poder concluir que el modelo se ajusta a la población en estudio, la probabilidad obtenida debe ser mayor o igual a 0.05 (Tabashnik and Black, 1996; Blouin *et al.*, 1996).

Una desviación de los valores esperados puede deberse a varias causas. Un exceso de homocigotos puede deberse a cuatro factores: que el locus en análisis puede estar bajo selección; que la presencia de alelos nulos puede estar provocando un exceso de homocigotos; que la endogamia sea común en la población, disminuyendo la variabilidad o que la presencia de una subestructuración en la población esté provocando el **efecto de Wahlund**. En el último caso, el apareamiento ocurre entre individuos más relacionados entre sí, creando una ascendencia común que posee los mismos alelos, lo cual conlleva a una descendencia con un nivel de homocigosidad alto. La probabilidad de que estas explicaciones se lleven a cabo debe ser corroborada con información adicional, por ejemplo la distribución de las poblaciones en estudio. En el caso del *T. cruzi* la desviación del equilibrio de Hardy Weinberg se explica por la estructura clonal, en la cual la reproducción sexual es rara o inexistente (Dorak, 2003; Oliveira *et al.* 1998).

3. **Polimorfismo de microsatélites.** Para analizar el polimorfismo de los loci amplificados por los cebadores diseñados en el *Trypanosoma cruzi* se analiza únicamente la frecuencia alélica y el grado de similaridad entre cada muestra. Este enfoque se debe a que estudios anteriores proveen evidencias de un genoma poliploide y una desviación de Hardy y Weinberg (Oliveira *et al.*, 1998; Gaunt *et al.*, 2003).

Se considera polimórfico un locus cuyo alelo predominante, o más común, tiene una frecuencia menor o igual a 0.95; aunque este valor puede variar. Por otro lado, el número de alelos promedio por locus también es un grado de polimorfismo; a mayor valor, mayor polimorfismo. Para poder comparar en forma estandarizada el número de alelos entre poblaciones, se utiliza el **número efectivo de alelos** o  $N_e$ . Este valor representa el número de alelos, con una misma frecuencia, necesarios en una población ideal para producir la homocigosidad observada en una población real. El  $N_e$  es el inverso de la homocigosidad como lo indica la siguiente ecuación:

$$N_e = \frac{1}{\text{Homocigocidad}} = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_E} \quad (2)$$

Donde  $P_i^2$  es la frecuencia del genotipo homocigoto y  $H_e$  es la heterocigocidad esperada

(Hartl and Clark, 1998).

El grado de polimorfismo es proporcional a la frecuencia de heterocigotos en la población, es decir, a mayor heterocigotos mayor polimorfismo (Hartl and Clark, 1998).

4. **Índice de Simpson.** El índice de Simpson es un enfoque no paramétrico utilizado para determinar la heterogeneidad de una muestra. Simpson (1949) no quería hacer suposiciones acerca de la curva de distribución de las especies y definió lo siguiente:

$$D = \sum (n/N)^2 \quad (3)$$

Donde D es el índice de Simpson, n es el número total de muestras con el genotipo particular y N es el número total de muestras.

(Larson, 2002; Offwell woodland & wildlife trust, 2002).

El índice de Simpson representa la probabilidad que dos individuos seleccionados al azar en una comunidad sean de la misma categoría. Los valores varían de 0 a 1, mientras más cercano a cero sea, mayor es la diversidad. Para ser más lógico se puede sustraer 1 al valor, definiendo el índice de diversidad de Simpson (1-D). El valor de esta medida también varía de 0 a 1, pero mientras más cercano a 1, mayor es la diversidad. En este caso, el dato indica la probabilidad que dos individuos tomados al azar pertenezcan a diferentes categorías. Otra forma de definir el índice de Simpson es determinar su recíproco (1/D). En este caso el valor más bajo es 1 y a mayor valor, mayor diversidad (Larson, 2002; Offwell Woodland & Wildlife Trust, 2002).

5. **Coefficiente de similaridad y distancia genética de Nei-Li.** El coeficiente de similaridad (S) es la proporción de los marcadores moleculares que son compartidos entre dos individuos comparados. Lo que se confronta entre dos organismos es el número de alelos, aparentemente del mismo tamaño, amplificados y separados mediante electroforesis. Generalmente, la **distancia genética (D)** se utiliza en lugar del coeficiente de similaridad. En la mayoría de los casos la distancia genética es simplemente uno menos el coeficiente de similaridad ( $D = 1 - S$ ) (NIU Bioinformatics and Genomics Center, 2003).

La distancia de Nei-Li puede utilizarse para analizar los resultados obtenidos con las técnicas de RFLP's, AFLP's, microsatélites y RAPD's. Para este método, se registra cada alelo amplificado en cada organismo. Este número corresponde al número de alelos totales. Luego, el número de bandas compartidas

con un segundo organismo se denomina el número de pares. El coeficiente de similaridad de Nei-Li es dos veces el número de pares dividido entre el número total de alelos. Este procedimiento es óptimo cuando el número de alelos nulos es escaso. Los marcadores que generalmente cumplen con lo requerido son los microsatélites y los RFLP's (NIU Bioinformatics and Genomics Center, 2003).

## 6. Método de agrupación aglomerativo, Agglomerative Nesting, AGNES, por sus siglas en inglés.

Por medio de las distancias genéticas establecidas es posible asignar cada muestra o población dentro de un grupo o *cluster*, produciendo un árbol o *dendrograma*. El algoritmo de agrupamiento aglomerativo, *agglomerative nesting*, AGNES, por sus siglas en inglés es un modelo jerárquico que determina las distancias entre grupos mediante el método de distancia media o método de agrupación en parejas con media aritmética no ponderada, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, UPGMA, por sus siglas en inglés. Al inicio, el algoritmo toma cada muestra como un grupo o *cluster*. En el primer paso las dos muestras con la menor distancia genética son agrupadas, creando un *cluster* con dos objetos, mientras que el resto sigue constituyendo una muestra. Luego, a cada paso, los dos grupos con la menor distancia son fusionados sucesivamente (Manchester Metropolitan University, 2003; Dudoit and Gentleman, 2002).

La distancia entre cada grupo se determina utilizando el UPGMA y se define como el promedio de todas las distancias entre los objetos de cada grupo. Sea  $R$  y  $Q$  dos grupos y  $|R|$  y  $|Q|$  el número de muestras de cada grupo respectivamente. La distancia,  $d(R, Q)$ , entre los grupos  $R$  y  $Q$  se define como el promedio de todas las disimilaridades  $d_{ij}$ , en donde  $i$  es un objeto cualquiera de  $R$  y  $j$  es un objeto cualquiera de  $Q$ .

$$d(R, Q) = \frac{\sum_{i \in R, j \in Q} d_{ij}}{|R||Q|} \quad (4)$$

(Dudoit and Gentleman, 2002).

El algoritmo AGNES calcula un coeficiente, denominado coeficiente de aglomeración, *Agglomerative Coefficient* o AC por sus siglas en inglés. Este valor permite medir la estructura de la agrupación de la información. El AC se define de la siguiente manera: Sea  $d(i)$  la distancia de la muestra  $i$  con el primer grupo al que se unió, dividido por la distancia del grupo al que se fusionó en el paso anterior del algoritmo. El AC se define como el promedio de todos  $[1-d(i)]$ . El valor de AC es adimensional, variando de 0 a 1. Un AC cercano a 1 indica que se encontró una estructuración clara en las muestras. Por el contrario, si es cercano a 0, indica que el algoritmo no ha encontrado una estructura natural. En otras palabras, la información consiste en un gran grupo (UNESCO, 2001).

La ventaja de los métodos jerárquicos aglomerativos es la rapidez del análisis. Sin embargo, la rigidez del algoritmo no permite corregir errores provocados al inicio (Dudoit and Gentleman, 2002).

7. Similaridad y distancia genética de Nei en poblaciones. Existen varios tipos de mediciones para estimar la similaridad y distancia genética utilizando frecuencia alélica. Una de éstas es la distancia genética (D) de Nei (1972), la cual se rige por el modelo de alelos infinitos o IAM por sus siglas en inglés *Infinite Allele Model*.

La determinación de la similaridad genética, I, de cualquier par de poblaciones, donde las frecuencias alélicas en el locus k en la población A son:  $a_1, a_2, a_3, \dots, a_i$  y en la población B:  $b_1, b_2, b_3, \dots, b_i$ , se calcula como

$$I = \frac{\sum (a_i \cdot b_i)}{\sqrt{\sum (a_i)^2 \sum (b_i)^2}} \quad (5)$$

(Tabashnik and Black, 1996).

La similaridad genética para cada locus muestreado se calcula y luego se usa para estimar la similaridad total utilizando la siguiente fórmula

$$I = \frac{I_{ab}}{\sqrt{I_a \cdot I_b}} \quad (6)$$

Donde  $I_{ab}$ ,  $I_a$ ,  $I_b$  son los promedios aritméticos sobre todos los loci de  $\sum a_i b_i$ ,  $\sum a_i^2$  y  $\sum b_i^2$

(Tabashnik and Black, 1996).

La distancia genética entre cualquier par de poblaciones es:

$$D = - \ln I \quad (7)$$

(Tabashnik and Black, 1996).

No importando la distancia elegida, cuando se estudian poblaciones genéticamente similares se requiere de una muestra grande y de locus con más de un alelo para producir mejores estimados de distancia genética. En 1983 Nei *et al.* determinaron que se necesitan más de 30 locus para construir árboles filogenéticos. Se cree que existe un consenso que estima que los árboles son generalmente erróneos cuando se utilizan menos de 30; incluso en poblaciones cercanamente relacionadas pueden ser necesarios hasta 100 locus para estimar con exactitud las relaciones por métodos de distancia genética (Dorak, 2003).

### III. HIPÓTESIS

Existen loci de microsatélites polimórficos en cepas de *Trypanosoma cruzi*, aisladas de triatomíneos recolectados en áreas endémicas de Guatemala.

## IV. OBJETIVOS

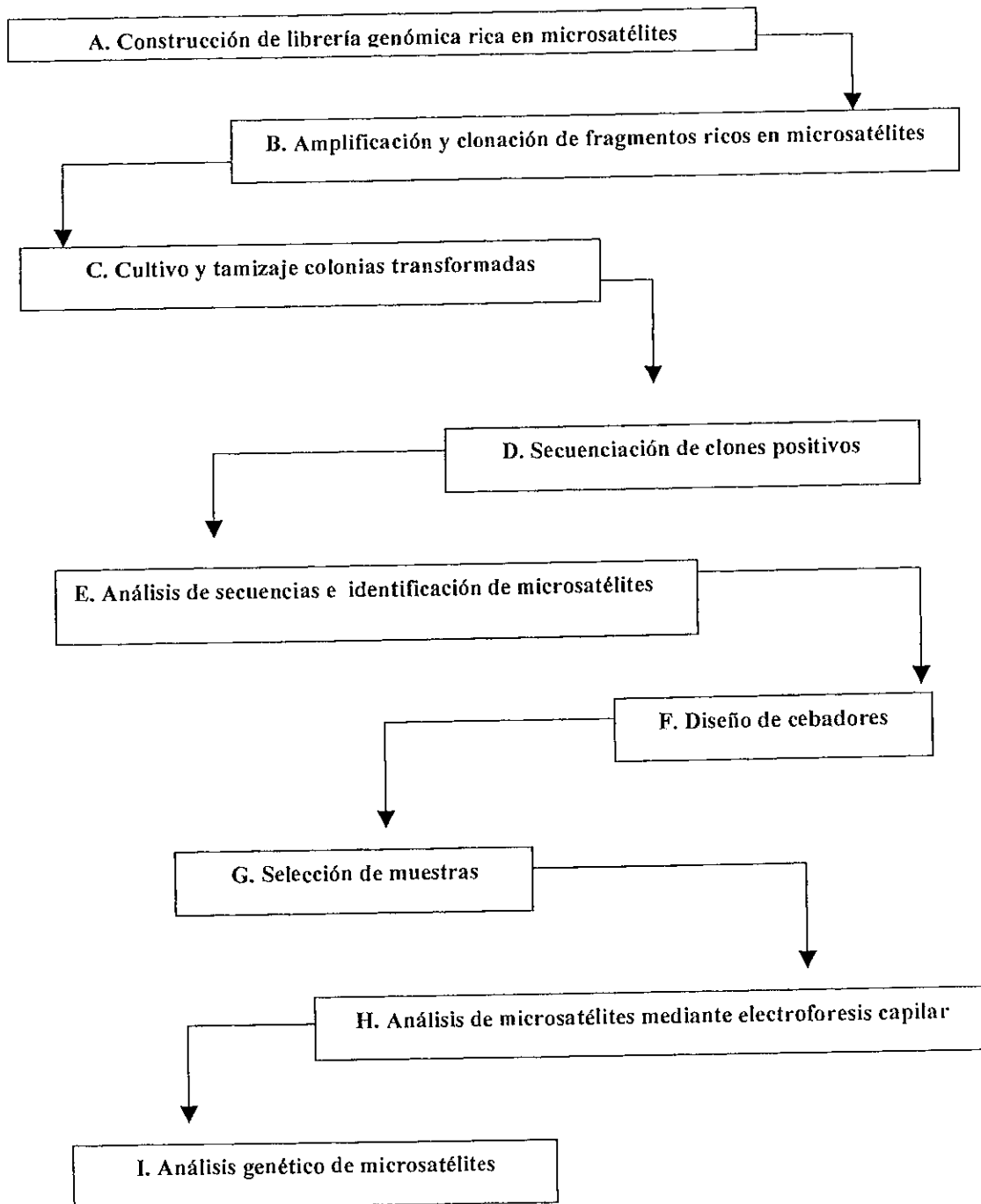
### A. Objetivo general

Identificar y caracterizar microsatélites polimórficos en cepas de *Trypanosoma cruzi*, aisladas de triatomíneos recolectados en áreas endémicas de Guatemala.

### B. Objetivos específicos

1. Construir una librería de ADN total de *Trypanosoma cruzi*, enriquecida con microsatélites.
2. Amplificar y clonar regiones del ADN total de *Trypanosoma cruzi* ricas en microsatélites.
3. Secuenciar los fragmentos clonados, ricos en microsatélites.
4. Identificar microsatélites en las muestras secuenciadas.
5. Determinar el polimorfismo de los loci de microsatélites detectados en cepas de *Trypanosoma cruzi*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS



## A. Construcción librería genómica, rica en microsatélites

### 1. Extracción de ADN total de *Trypanosoma cruzi*. La extracción del

ADN total del aislado de *Trypanosoma cruzi* cepa H7 aislada de ser humano proveniente de Guatemala se realizó a partir de 45mL del cultivo del parásito. La alícuota del cultivo se centrifugó a 3000xg, por 15 minutos, y se lavó en 25mL de PBS 1X. El pellet se resuspendió en 350µl buffer de lisis (Dodecil sulfato o SDS por sus siglas en inglés, a una concentración final de 1%, EDTA a una concentración final de 25mM, NaCl a una concentración final de 0.4M, Tris-HCL, pH 7.5, a una concentración final de 50mM) con proteinasa K a una concentración final de 400 µg/ml y se incubó toda la noche a 56°C. Se agregó 1 volumen de fenol-Tris saturado, se invirtió 10 veces hasta que la solución se vio lechosa y se centrifugó a 12000xg, por 4 minutos, a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregó 1µL de RNAsa a c.f de 500 µg/mL y se incubó 30 minutos, a temperatura ambiente. Se agregó 1 volumen de fenol-Tris saturado, se invirtió 10 veces hasta que la solución se vio lechosa y se centrifugó a 12000xg, por 4 minutos, a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamilico (25:24:1), se mezcló por inversión hasta que la solución se vio lechosa y se centrifugó a 12000xg, por 4 minutos, a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamilico (25:24:1), se mezcló por inversión hasta que la solución se vio lechosa y se centrifugó a 12000xg, por 4 minutos, a temperatura ambiente. Se agregó 1 volumen de cloroformo/isoamilico (24:1), se invirtió unas 10 veces y se centrifugó a 12000xg, por 4 minutos, a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio, pH 5.2, a una concentración final de 0.3M, se mezcló y se agregó 2.5 volúmenes de etanol frío. Se dejó precipitando el ADN a -20°C, toda la noche. Se centrifugó a 12000xg, por 10 minutos, a 4°C. Se lavó con etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 12000xg. Se secó el pellet invirtiendo el tubo sobre un kimwipe el tiempo necesario (de 30 minutos a 1 hora). Se resuspendió en 50µL de buffer Tris EDTA (TE) toda la noche a 4°C. En el caso de los aislados de Panamá, el ADN se diluyó hasta obtener una concentración de 1ng/µL. Se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

### 2. Cuantificación de ADN en fluorómetro. El ADN se cuantificó en el

fluorómetro DyNA Quant™200 (Hoeffer). Se siguió el protocolo dado por el fabricante, se calibró el equipo agregando 2 µL del estándar de ADN de timo de cabra a una concentración final de 100ng/µL, en 2mL de buffer de ensayo de bajo rango ("Low range buffer"). Se cuantificó el ADN agregando 2 µL de la muestra en 2mL de buffer de ensayo de bajo rango.

### 3. Aislamiento de fragmentos de ADN de *Trypanosoma cruzi* ricos

en microsatélites. El aislamiento de fragmentos de ADN de *Trypanosoma cruzi*, ricos

en microsatélites, se realizó en el laboratorio ecológico Savannah River de la Universidad de Georgia (Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia). Se utilizó el protocolo “Microsatellites isolation with Dynabeads 2002<sup>®</sup>” disponible en [http://www.uga.edu/srel/DNA\\_Lab/Msat\\_Easy\\_Isolation\\_2000.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/Msat_Easy_Isolation_2000.rtf). (se adjuntó en el Apéndice A)

El ADN genómico del parásito se enriqueció utilizando tres tipos de mezclas de oligonucleótidos, denominadas elusión enriquecida 2 (EE2), elusión enriquecida 3 (EE3) y elusión enriquecida 4 (EE4). Cada una corresponde a las mezclas de oligonucleótidos indicadas en el cuadro 7.

Cuadro 7

Mezclas de oligonucleótidos utilizados durante el enriquecimiento del ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* en el Laboratorio de Savannah Ecology

Mezcla de oligonucleótidos	Mezcla	Concentración (μM)	Volumen (μL)
Mezcla 2 (Elusión enriquecida 2)	(TG) <sub>12</sub> , (AG) <sub>12</sub> , (AAG) <sub>8</sub> , (ATC) <sub>8</sub> , (AAC) <sub>8</sub> , (AAT) <sub>12</sub> , (ACT) <sub>12</sub>	100	200
Mezcla 3 (Elusión enriquecida 3)	(AAAC) <sub>6</sub> , (AAAG) <sub>6</sub> , (AATC) <sub>6</sub> , (AATG) <sub>6</sub> , (ACCT) <sub>6</sub> , (ACAG) <sub>6</sub> , (ACTC) <sub>6</sub> , (ACTG) <sub>6</sub>	100	150
Mezcla 4 (Elusión enriquecida 4)	(AAAT) <sub>8</sub> , (AACT) <sub>8</sub> , (AAGT) <sub>8</sub> , (ACAT) <sub>8</sub> , (AGAT) <sub>8</sub>	100	200

## B. Amplificación y clonación de fragmentos ricos en microsatélites

### 1. Amplificación de fragmentos de ADN de *Trypanosoma cruzi*,

ricos en microsatélites, mediante reacción en cadena de la

polimerasa. Las tres soluciones de ADN, enriquecidas con microsatélites, se

resuspendieron en 23μL de agua, doblemente destilada, durante toda la noche, a 4°C y se amplificaron mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de la reacción fue de 50μL. Las condiciones de la reacción fueron: 0.1μL de solución enriquecida/μL volumen final de reacción ó 0.05μL de solución enriquecida/μL de volumen final de reacción; Taq buffer 1X (a una concentración final de 10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, Promega); MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2.0mM; deoxinucleótidos a una concentración final de 0.15mM cada uno; el cebador super SSNX (5'GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC3') a una concentración final de 0.5μM y ADN polimerasa *Taq* a una concentración final de 0.03 unidades/μL. La reacción de amplificación se

llevó a cabo en el termociclador Genius (Techne) y consistió en una desnaturalización inicial rápida a 95°C, por 2min, seguida de una serie de 30 ciclos compuestos de una desnaturalización a 95°C por 20seg., una hibridación a 60°C por 20seg. y una elongación a 72°C por 90seg. Al finalizar el programa, la reacción se llevó a 15°C. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en una gel de agarosa al 1% en 1X TBE. La gel se sometió a 8.5V/cm. El “smear” alrededor de 500pb se detectó tiñendo la gel en bromuro de etidio (a una concentración final de 0.5µg/mL), durante 15min. y se observó bajo radiación UV.

## 2. Purificación del producto de la reacción en cadena de la

polimerasa. Se utilizaron las columnas de purificación de PCR Amicon®Microcon-PCR centrifugal filter devices (Micon Bioseparations Millipore) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Cada muestra se resuspendió en 20µL de buffer TE.

## 3. Ligación al vector del producto de la reacción en cadena

de la polimerasa purificado. Una vez purificado el producto de PCR, se cuantificó la cantidad de ADN en el fluorómetro DyNA Quant™200 (Hoeffer) y se determinó la cantidad necesaria a utilizar para la reacción de ligación con el vector comercial pGEMT-Easy (A1360, Promega) a las razones molares de inserto:vector de 3:1 y 1:3, con un volumen final de 10µL. Las condiciones de la reacción de ligación fueron: buffer de ligación rápida T4 ADN ligasa a una concentración final de 1X (Promega), vector pGEMT-Easy (Promega) a una concentración final de 5ng/µL, volumen de producto de PCR purificado necesario para obtener una razón de inserto:vector 3:1 ó 1:3, ADN T4 ligasa a una concentración final de 0.3unidades Weiss/µL de reacción y volumen de agua doblemente destilada necesario para aforar a 10µL. La reacción se llevó a cabo dejándola a 4°C, toda la noche; se inactivó la enzima incubando la reacción a 70°C, por 10 minutos, y después de agregar 10µL de agua, se purificó con acetato de sodio/etanol. El producto ligado se resuspendió en 10µL de agua doblemente destilada incubándolo toda la noche, a 4°C.

## 4. Transformación del vector con el inserto. Se transformaron las células

XL1-Blue electrocompetentes con el producto de PCR ligado al pGEMT-Easy purificado de acuerdo al protocolo de electroporación proporcionado por el fabricante del equipo Gene Pulser II (Biorad): Se agregó 1µL del vector con el inserto y 40µL de células XL1-Blue electrocompetentes en la celda desechable de 0.2 cm (Biorad), enfriada previamente a -20°C. Se electroporó cada muestra bajo las mismas condiciones: capacitancia 25µF, voltaje 2.5kV y resistencia 200 ohms. Inmediatamente después de la electroporación, las muestras se incubaron en 1mL de medio isotónico (SOC) a 37°C por 1 hora a 225rpm. Al finalizar, cada muestra se plaqueó paralelamente en medio de cultivo LB con tetraciclina (12.5µg/µL), ampicilina o carbenicilina (100µg/mL), isopropil-1-tio-β-D-galactosidasa o IPTG por sus

siglas en inglés (0.8mg), X-gal (0.8mg); y en medio de cultivo LB con tetraciclina (12.5µg/µL), ampicilina o carbenicilina (100µg/mL) y X-galactosa (0.8mg). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

### C. Cultivo y tamizaje de colonias transformadas

A partir de las células transformadas que crecieron en las placas, se determinó el porcentaje de colonias azules, celestes y blancas. De éstas se seleccionaron al azar 95 colonias transformadas (colonia blanca) y 1 no transformada como control negativo (colonia azul) para completar una placa de cultivo de 96 pozos. Luego, se realizaron los dos procedimientos siguientes en forma paralela: Por un lado se cultivaron en medio de cultivo líquido LB con ampicilina (a una concentración final de 100µg/mL) y tetraciclina (a una concentración final de 12.5µg/µL). Por otro lado se realizó un tamizaje mediante una reacción en cadena de la polimerasa para distinguir aquellas colonias transformadas con el vector que contenían el inserto de las que no lo poseían. Para lograr ambos protocolos se tomó la colonia elegida de la placa de LB con un palillo de madera, se agitó primero en 200µL de medio LB líquido con ampicilina y tetraciclina (cf. 100µg/mL y 12.5µg/µL respectivamente) para cultivar la colonia y, luego, en 100µL de agua doblemente destilada para lisar la bacteria. La colonia resuspendida en el medio LB se incubó toda la noche a 37°C y 200rpm. Luego de esta incubación se almacenaron a -80°C para su uso posterior. La colonia lisada en agua se utilizó como ADN templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de la reacción para tamizaje fue de 25µL. Las condiciones de la reacción fueron: 0.2µL de ADN templado/µL de volumen final de reacción; Taq buffer 1X (a una concentración final de 10mM Tris-HCl pH 9, 50mM , 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, Promega); MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5mM; deoxinucleótidos a una concentración final de 0.15mM cada uno; los cebadores M13F universal (5'GTTTCCAGTCACGAC3') y M13R diseñado (ATGACCATGATTACGCC) a una concentración final de 0.25µM cada uno y la ADN polimerasa *Taq* a una concentración final de 0.02 unidades/µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador I-cycler (Biorad), y consistió en una desnaturalización inicial rápida, a 95°C, por 3min, seguida de una serie de 35 ciclos compuestos de una desnaturalización, a 95°C, por 20seg., una hibridación, a 60°C, por 20seg. y una elongación, a 72°C, por 90seg. Al finalizar el programa, la reacción se llevó a 15°C. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% en 1X TBE. La gel se sometió a 8.5V/cm. La banda mayor a 220pb se detectó tificando la gel en bromuro de etidio (a una concentración final de 0.5µg/mL), durante 15 min. y se observó bajo radiación UV.

### D. Secuenciación de clones positivos

Las colonias positivas se secuenciaron en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Yale y Macrogen, disponibles en <http://info.med.yale.edu/wmkeck/dnaseq/> y <http://www.macrogen.com/>

english/index.html respectivamente. En ambas instalaciones se utilizó el secuenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. En el primer laboratorio se requirió de 10-20ng por cada 200 pares de bases del producto de PCR por reacción; mientras que en el segundo se recomendó el uso de 20µL del producto de PCR a una concentración de 50ng/µL por muestra. En ambos casos se envió por separado cada cebador (M13 *Reverse* diseñado y M13 *Forward* a una concentración final de 10pmol/µL) y el ADN necesario, previamente purificado mediante el uso de las columnas de purificación de PCR Amicon®Microcon-PCR centrifugal filter devices (Micon Bioseparations Millipore).

## E. Análisis de secuencias e identificación de microsatélites

Las secuencias obtenidas a partir de los clones positivos secuenciados se analizaron con el programa Windows 32 SeqMan 5.03 de DNASTAR. El procedimiento que se siguió para cada uno de los 44 clones positivos secuenciados fue el siguiente: en un primer paso se escogieron los interferogramas obtenidos con los cebadores M13*forward* y M13*Reverse*, luego, se eliminaron las secuencias correspondientes al vector pGEMTeasy y a los posibles ruidos mediante los comandos “*Set vector*” y “*Trim ends*” respectivamente. Después se alinearon las secuencias obtenidas por cada cebador mediante el comando “*Assemble*”. Con este procedimiento se obtuvo la secuencia consenso registrada.

A partir de las secuencias consenso de cada clon secuenciado se hizo una búsqueda en el BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica, o NCBI por sus siglas en inglés, para eliminar aquellas que correspondieran a genes y a microsatélites polimórficos previamente reportadas por Oliveira, *et. al.*.

Luego de este tamizaje se identificaron manualmente los microsatélites. Se definió como microsatélite aquella secuencia cuyo motivo de repetición detectado tuviera un mínimo de ocho repeticiones, de acuerdo a lo optado por Oliveira *et al.* 1998.

## F. Diseño de cebadores

Los 9 pares de cebadores se diseñaron utilizando el programa Primer3, disponible en [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Los cebadores se crearon a partir de las secuencias de la **región flanqueante** al microsatélite identificado. Las condiciones utilizadas durante el procedimiento fueron las recomendadas por el programa para evitar cualquier problema de apareamiento de los cebadores *forward* con *reverse* y de los cebadores *forward* con *forward* y *reverse* con *reverse*. A continuación se enumeran las condiciones: una estabilidad máxima para los cinco nucleótidos localizados en el extremo 3' de cada cebador, *forward* y *reverse*, de 9.0 (el valor corresponde al máximo delta G para una interrupción

para los cinco nucleótidos calculado utilizando el parámetro más cercano de vecindad, publicado en Breslauer, Frankm, Bloeker y Marky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83:3746-3750; Rychlik recomienda un valor máximo de 9.00); un valor máximo de mal apareamiento de 12.00; un valor máximo de mal apareamiento en pares de 24.00; un tamaño de cebador entre 18 y 27 pares de bases, con un óptimo de 20 pares de bases; una temperatura de fusión entre 57.0 y 63.0°C, con una óptima de 60.0°C (el programa calcula esta temperatura utilizando la fórmula dada por Rychlik, Spencer y Rhoads, Nucleic Acid Research, vol. 18, 12, 6409-6412); un porcentaje de GC entre 20.0 y 80%; un puntaje máximo de autocomplementaridad de 8.00; un puntaje máximo de complementaridad en el extremo 3' de 3.00 y no se permitió ni la presencia de una base desconocida en cualquier cebador ni la acumulación de nucleótidos GC seguidos. Cabe mencionar que el programa calcula los valores de temperatura de fusión de cada cebador ( $T_m$ ) utilizando una concentración de sales de 50.0mM y una concentración de oligonucleótidos en la reacción de PCR de 50.0nM. Para escoger los mejores pares de cebadores el programa se basó en un sistema de pesos, en los cuales, se toma en cuenta todos los factores anteriormente mencionados.

El nombre de los pares de cebadores se fijó utilizando la identificación de la secuencia del clon positivo escogido. Una misma temperatura de hibridación de 55°C fue utilizada para amplificar el ADN genómico templado de los 25 aislados de Guatemala, ocho aislados de Panamá, seis aislados de Ecuador y tres aislados de Brasil (cabe mencionar que se utilizó 1 $\mu$ L de una dilución 1:10 de los aislados de Guatemala, Ecuador y Brasil; y 1ng de los aislados de Panamá como ADN templado en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) con todos los pares de cebadores diseñados.

Los microsatélites se amplificaron a partir del ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa con un volumen de reacción final de 15  $\mu$ L. Esta consistió en 0.07 $\mu$ L de ADN templado/ $\mu$ L de volumen final de reacción; Taq buffer 1X (a una concentración final de 10mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 1.5mM de  $MgCl_2$ , 0.1% Triton X-100, Promega);  $MgCl_2$  a una concentración final de 1.6mM; deoxinucleótidos a una concentración final de 0.2mM cada uno; el cebador *forward*, diseñado específico para microsatélites y marcado previamente con los colorantes 5-Fam ó 5-Hex, a una concentración final de 0.75 $\mu$ M; el cebador *reverse*, diseñado específico para microsatélites, a una concentración final de 5ng/ $\mu$ L y la ADN polimerasa *Taq* a una concentración final de 0.03 unidades/ $\mu$ L. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador I-cycler (Biorad) y consistió en una desnaturalización inicial rápida a 94°C por 5min, seguida de una serie de 30 ciclos compuestos de una desnaturalización a 94°C por 30seg., una **hibridación** a 55°C por 28seg. y una elongación a 72°C por 30seg.; seguido de una elongación final a 72°C por 45minutos. Al finalizar el programa, la reacción se llevó a 4°C.

El pre-análisis de la utilidad de los pares de cebadores diseñados y la optimización del programa de PCR, basándose en la amplificación o no de algún producto y en la cantidad de éste respectivamente, se realizó utilizando como ADN templado 1 $\mu$ L de la dilución 1:10 de los siguientes cuatro aislados de *T.*

*cruzi*: el clon 6 del aislado de la cepa H7, el aislado 57, el aislado 42 y la cepa Y-Brazil. La optimización del programa de la reacción de PCR consistió en variar la temperatura de hibridación de 55 a 57°C.

Para observar la amplificación de producto se montó 5µL del producto de PCR en una gel de poliacrilamida vertical de concentración constante de 10% y una razón de acrilamida:bis de 29:1; se corrió en la cámara electroforética Miniprotean II cell (Biorad), a 4°C por 110 minutos a 15mA constantes utilizando como fuente de poder la EC-600 (Aparatus Corporation) y como buffer de corrida el TBE 0.5X. La banda, de existir, se detectó mediante una tinción con plata en base al protocolo descrito por Black, *et al.* (1997). Cabe destacar que este proceso de correr en geles de poliacrilamida se llevó a cabo únicamente para las muestras analizadas en el pre-análisis, el resto se analizó directamente en el secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem).

## G. Selección de muestras

El ADN utilizado para construir la librería genómica correspondió al *Trypanosoma cruzi* cepa H7 aislada de ser humano, almacenado el nueve de enero del 2002 en suero bovino fetal, o FBS por sus siglas en inglés, al 5% en Dimetil sulfoxí o DMSO, a -80°C; cultivado luego de un descongelamiento rápido o *quick thaw* a 28°C por aproximadamente 3 semanas (Comunicación personal, Edgar Quemé).

Los aislados de *T. cruzi* utilizados para la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvieron de las especies de triatominos, *Triatoma dimidiata*, recolectados en una encuesta domiciliar con muestreo al azar en Jutiapa (*vid* cuadro 7 para la identificación y localización) durante el Proyecto Encuesta Entomológica basal, TDR/WHO, no. 990545, Investigadora Principal Licda. Celia Córdón.

Los aislados de Guatemala de *T. cruzi*, utilizados para el análisis del polimorfismo de los microsátélites diseñados en el estudio, se obtuvieron de los vectores triatominos *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* recolectados en una encuesta domiciliar con muestreo al azar en seis departamentos endémicos con la enfermedad de Chagas en Guatemala (*vid* figura 13) durante el Proyecto Encuesta Entomológica basal, TDR/WHO, no. 990545, Investigadora Principal Licda. Celia Córdón. Dichos departamentos fueron Zacapa, Jutiapa, Jalapa, Santa Rosa, Chiquimula y Baja Verapaz. La distribución y localización de los aislados analizados se presentan en la figura 13 y en el cuadro 8. Los parásitos se aislaron del intestino de aquellos triatominos infectados por el *T. cruzi*. La infección del triatolino se determinó si se observaron bajo el microscopio los parásitos en las heces. A aquellos triatominos infectados se les removió el intestino bajo la campana de flujo laminar y se maceró, mediante un pistilo estéril, en 100µL de solución salina de fosfatos amortiguadora, *phosphate buffer saline* o PBS por sus siglas en inglés, a pH 7.4 (a una concentración final de 137mM NaCl; 2.7mM KCl; 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O;

1.4mM  $K_2HPO_4$ ). Luego, se agregó 1mL de PBS con penicilina/streptomina a 3000unidades/mL y se incubó toda la noche a 4°C. Luego, 500  $\mu$ L del macerado se inocularon en 3mL de infusión de triptosa e hígado, o LIT por sus siglas en inglés *Liver Infusión Tryptose*, con suero bovino fetal al 10%. Este cultivo se monitoreó de 3 semanas a 1 mes hasta que el parásito llegara al estadio de epimastigote. De este cultivo, se tomó 1mL para la extracción del ADN de acuerdo al procedimiento explicado en el siguiente inciso. El ADN extraído se almacenó a -20°C (Comunicación personal Pamela Pennington).

Los aislados de Panamá de *T. cruzi*, utilizados para el análisis del polimorfismo de los microsatélites diseñados en el estudio, se obtuvieron del vector triatomino *Rhodnius pallescens* procedente de una palma real (*Attalea butyracea*), en la comunidad de Buenos Aires, Chilibre, cercana al Canal de Panamá (vid figura 12). Las cepas se aislaron en medio bifásico, con medio Seneckjies como fase sólida y LIT como fase líquida; y el ADN se obtuvo mediante el método de extracción fenol-cloroformo. Cada ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se diluyó hasta obtener una concentración de 1ng/ $\mu$ L. Al igual que los aislados de Guatemala, los parásitos no fueron clonados (Comunicación personal, Franklyn Samudio).

Los aislados de Ecuador de *T. cruzi* utilizados para el análisis del polimorfismo de los microsatélites diseñados en el estudio, se obtuvieron de mamíferos (roedores, marsupiales y perro) provenientes de la provincia de Manabí, región costera (coordenadas aproximadas: longitud -80.489; latitud -1.029) (vid figura 14). Las cepas se aislaron de un hemocultivo de la sangre del mamífero y el ADN se obtuvo mediante el uso del protocolo recomendado por el fabricante del kit Quiagen DNAeasy. Al igual que los aislados de Guatemala y Panamá, los parásitos no fueron clonados (Comunicación personal, Mario Grijalva).

## H. Análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar

Los productos de PCR obtenidos de los cebadores diseñados se corrieron en el secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem) de acuerdo al siguiente procedimiento: se preparó el master mix para 98 reacciones compuesto de 8.5 $\mu$ L de formamida y 0.5 $\mu$ L de marcador *Rox* por reacción. Se agregó 9 $\mu$ L de la mezcla y 1 $\mu$ L del producto de PCR obtenido de cada muestra en análisis a cada pozo de la placa

Cuadro 8  
Descripción de los aislados de *T. cruzi* analizados de Guatemala, Panamá,  
Ecuador y Brasil

A. Muestras de Guatemala

No. Aislado	ID* <sup>1</sup>	Departamento	Municipio	Localidad	Fuente	Linaje* <sup>2</sup>
42	22-090-80 D1	Jutiapa	El Coyol	Jutiapa	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
57	22-360-2 D1	Jutiapa	Los Ranchos	Quesada	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
4	22-012-8 D1	Jutiapa	Cerro de Piedra	El Adelanto	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
10	19-111-10 D1	Zacapa	San Miguel	Huité	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
11	19-144-22 D1	Zacapa	Plan del Morro	Zacapa	T. dimidiata	1/2
12	19-131-24 R6	Zacapa	Cerro Grande	Zacapa	R. prolixus	2
14	19-110-1 D1	Zacapa	Guacamayo	Huité	T. dimidiata	2
18	20-095-16 D1	Chiquimula	Encuentros	San Juan Hermita	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
23	6-015-12 D1	Santa Rosa	El Pinito	Cuilapa	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
24	20-226-7 D2	Chiquimula	Socorro	Concepción las Minas	T. dimidiata	2
25	6-001-4 D3	Santa Rosa	Bijaques	Barberena	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
27	6-024-9 D2	Santa Rosa	San Juan Arana	Cuilapa	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
29	6-030-6 D1	Santa Rosa	Rinconcito	Santa Rosa de Lima	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
38	22-043-88 N5	Jutiapa	La Perla	Yupiltepeque	T. dimidiata	2
40	20-158-2 D3	Chiquimula	El Limón	Quetzaltepeque	T. dimidiata	2/1
50	22-154-139 D1	Jutiapa	Morán	El Progreso	T. dimidiata	0 <sup>‡</sup>
66	21-067-22 R1	Jalapa	Ventatas	San Manuel Chaparrón	R. prolixus	2
68	21-104-7 D1	Jalapa	El Plash	Monjas	T. dimidiata	2
71	21-113-4 D1	Jalapa	Las Lomas	Monjas	T. dimidiata	1
72	22-386-4 D1	Jutiapa	El Tablón	San José Acatempa	T. dimidiata	2
81	20-007-11 D1	Chiquimula	El Quebracho	Camotán	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
112	20-322-3 D1	Chiquimula	Cerritos	Ipala	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
114	15-117-21 D1	Baja Verapaz	Saltán	Granados	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
116	15-155-5 D18	Baja Verapaz	San Juan las Vergns	Cubulco	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
122	15-073-16 D1	Baja Verapaz	San Francisco	San Miguel Chicaj	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
124	15-082-1 D1	Baja Verapaz	El Progreso	San Miguel Chicaj	T. dimidiata	N/D <sup>†</sup>
Clon 6, Cepa H7	N/D	Santa Rosa	N/D	N/D	Humano	2

## B Muestras de Panamá, Ecuador y Brasil

No. Muestra	ID*2	País	Provincia	Comunidad	Fuente	Linaje*2
1510	GML1510	Panamá	N/D	Vientos Franco, Chilibre	R. Pallescens	2
1541	GML 1541	Panamá	N/D	Buenos Aires, Chilibre	R. Pallescens	N/D
1542	GML 1542	Panamá	N/D	Fronco, Chilibre	R. Pallescens	2
1558	GML 1558	Panamá	N/D	Ñaju, Chilibre	R. Pallescens	N/D
1559	GML 1559	Panamá	N/D	Ñaju, Chilibre	R. Pallescens	N/D
1564	GML 1564	Panamá	N/D	Buenos Aires, Chilibre	R. Pallescens	N/D
1570	GML 1570	Panamá	N/D	Buenos Aires, Chilibre	R. Pallescens	N/D
1587	GML 1587	Panamá	N/D	Burunga, Arraijan	R. Pallescens	N/D
6303	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	2
6307	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	2
6312H	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	2
6320	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	2
6326	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	N/D
DOG	N/D	Ecuador	Manabí	N/D	Mamífero	2
Cepa Y	N/D	Brasil	Sao Paulo	N/D	Humano	1
Brazil	N/D	Brasil	N/D	N/D	N/D	2
Can 3	N/D	Brasil	Pará	Belém	Humano	N/D
YB	N/D	Brasil	Sao Paulo	N/D	Humano	1

\*1 ID: identificación utilizada para los aislados en el laboratorio de Control de Chagas del Centro de Estudios de Salud CDC-MERTU, Guatemala. ID\*2 : identificación utilizada para los aislados en departamento de Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ministerio de Salud, Panamá \*2 Determinación del tipo de linaje mediante cebadores TC, TC1 y TC2 (Comunicación personal Alejandra Krische). 0<sup>2</sup> Linaje no determinado aún, no pertenece ni al linaje 1 ni al linaje 2. N/D: No disponible.

Figura 12

Lugar de colecta de los triatominos a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de *T. cruzi* en la República de Panamá

(Adaptado de Ku Aktuelle, 2003)

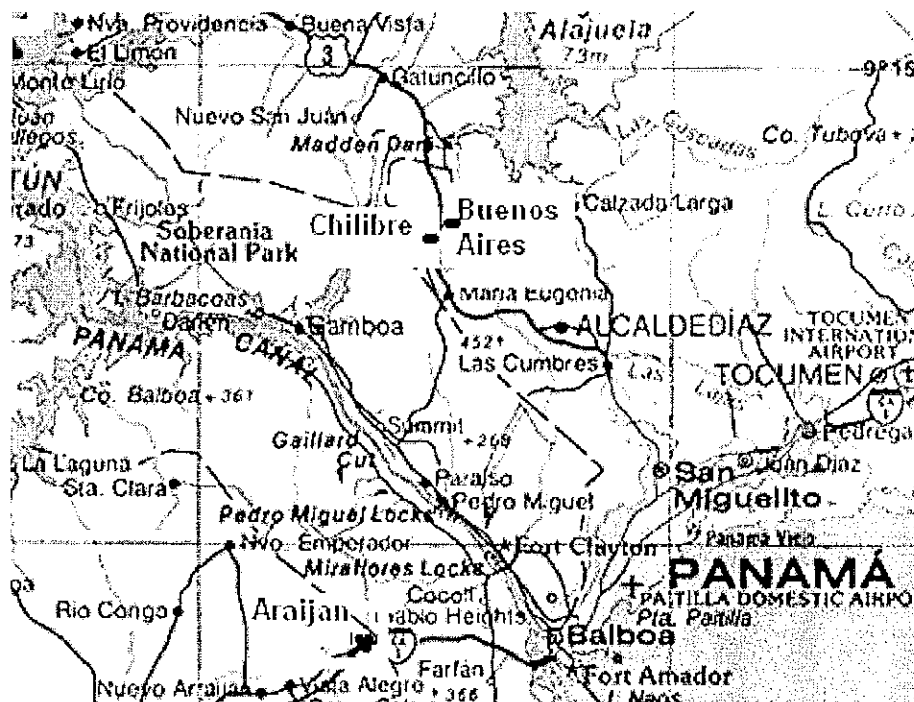


Figura 13

Lugar de colecta de los triatomos domésticos a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de *T. cruzi* en la República de Guatemala

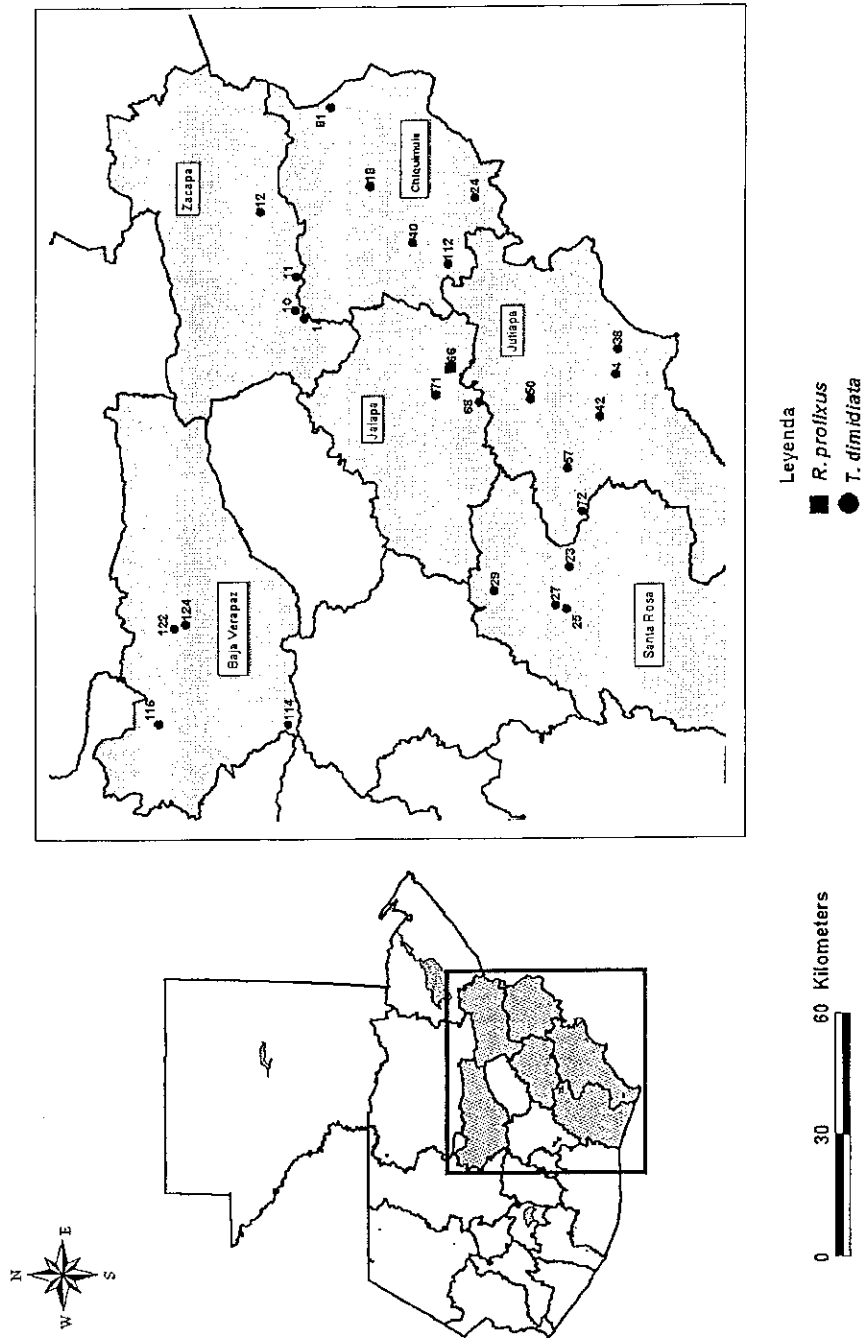
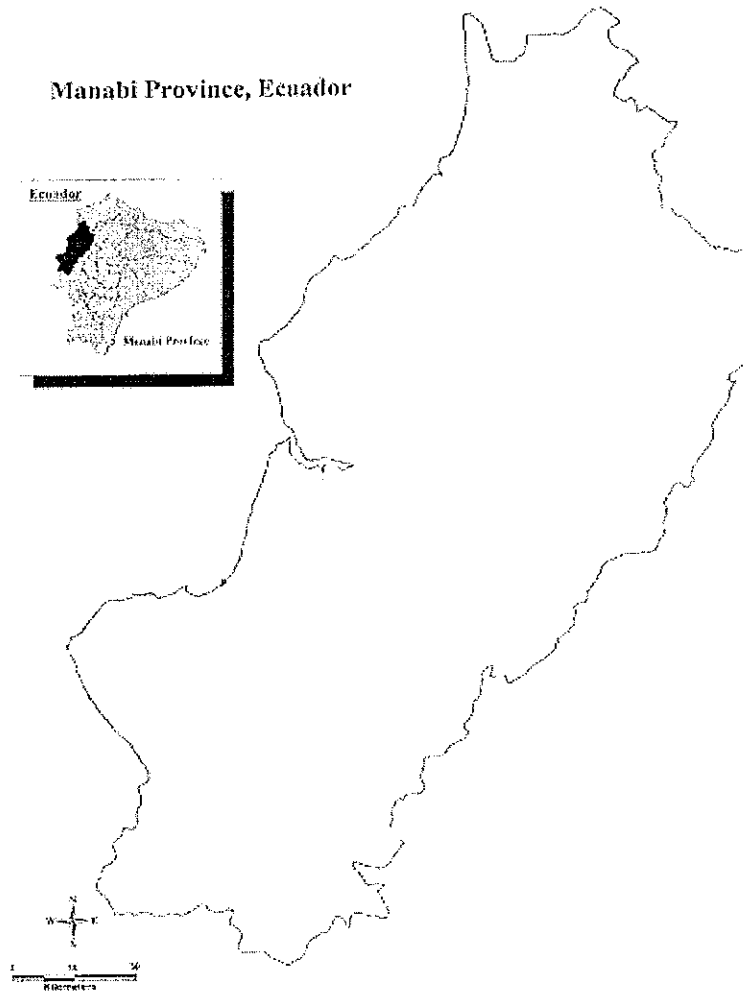


Figura 14

Lugar de colecta de los reservorios a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de *T. cruzi* en la República de Ecuador  
(Grijalva, 2002)



de 96 pozos. Luego se incubó la placa a 95°C por 3 minutos y después en hielo por 3 minutos más. Una vez preparada la placa, ésta se montó en el equipo.

Los resultados obtenidos por el programa el programa GeneScan (Applied Biosystem) se analizaron manualmente registrando el tamaño, en pares de bases; la intensidad, en unidades de intensidad y el área para los picos observados en el **electroferograma**.

## I. Análisis genético de microsatélites

Luego de escoger los picos reales se determinó la frecuencia alélica, el número de alelos, el número de alelos efectivos, la heterocigocidad observada y la esperada de cada locus. Estas cuantificaciones se calcularon separando las muestras primero por país y luego tomando Guatemala contra el resto de muestras. Los parámetros se establecieron utilizando el programa Genetic Analysis in Excel (GenAIEx) versión 5.04 para PC abril 2002 proporcionado por la Universidad Nacional de Australia y disponible en línea en <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>.

Luego se determinó el coeficiente de similitud de Nei-Li (S) y la distancia de Nei-Li ( $F = 1-S$ ) tomando los datos como individuos utilizando el programa R. Con la matriz creada a partir de la distancia de Nei se construyó el dendrograma correspondiente utilizando el método jerárquico de aglomeración, *Agglomerative Nesting*, AGNES, por sus siglas en inglés.

Una vez formados los grupos a partir del procedimiento anterior, se determinó la distancia genética de Nei (1978) para diferenciarlos genéticamente mediante el programa Popgene versión 1.31.

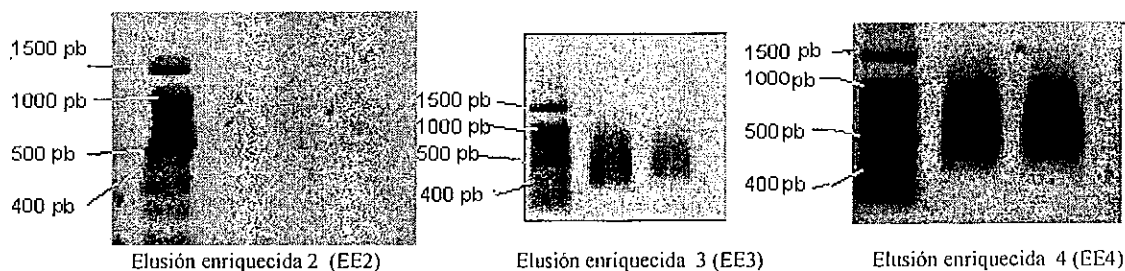
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Clonación de los fragmentos de ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* ricos en microsatélites

A partir de la amplificación de las soluciones enriquecidas obtenidas del laboratorio Savannah Ecology resultó una gama de fragmentos, cuyo tamaño varió desde 400 a 1200 pares de bases. En el caso de la elusión enriquecida número dos (EE2), la extensión observada en la gel tuvo una intensidad marcadamente menor que el de las otras dos soluciones como se observa en la figura 15. Cabe mencionar que esta elusión se diferencia de las otras dos elusiones enriquecidas, EE3 y EE4, por tener como fragmentos objetivo repeticiones consecutivas de di- y tri-nucleótidos contra tetra-nucleótidos. Se puede suponer que el proceso de enriquecimiento para la elusión dos no haya sido eficaz ya sea por la utilización de una temperatura de hibridación no óptima, la cual es crítica y dependiente de la naturaleza del ácido desoxirribonucleico, o por la realización de lavados muy astringentes que provocaron la pérdida de los fragmentos de interés en el sobrenadante.

Figura 15

Detección del ADN de *Trypanosoma cruzi* enriquecido con microsatélites amplificado con el cebador SSNX



Fila 1: marcador molecular de 100bp. Fila 2 y 3: producto de PCR de soluciones enriquecidas con el cebador SSNX

En un segundo paso se clonó la gama de fragmentos de ácido desoxirribonucleico obtenidos en la amplificación de las soluciones enriquecidas. Aunque el procedimiento se haya realizado de la misma manera, la eficiencia de la ligación fue similar entre las elusiones EE3 y EE4, pero mucho menor en el caso de la EE2. En los dos primeros casos hubo aproximadamente ocho veces más colonias blancas que azules, mientras que en el último caso crecieron más colonias azules que blancas (*vid* cuadro 9). Este resultado puso en evidencia la dificultad de trabajar con microsatélites con repeticiones consecutivas de di- o tri-nucleótidos.

Cuadro 9

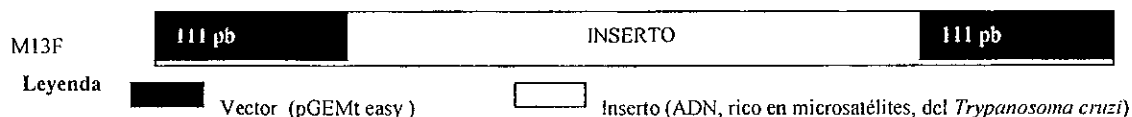
Eficiencia de ligación en elusiones enriquecidas 2, 3 y 4

Elusión	Colonias transformadas		Colonias no transformadas		Razón colonias blancas/azules
	No.	Porcentaje	No.	Porcentaje	
EE2	22	31.9	36	52.2	0.61
EE3	1575	86.2	195	10.7	8.1
EE4	846	86.5	107	10.9	7.9

Se seleccionó al azar 95 clones que habían incorporado el plásmido recombinante mediante la detección de la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Por medio de una reacción en cadena de la polimerasa se escogieron aquellos clones transformados con plásmidos que añadieron efectivamente el inserto de interés, denominados clones positivos. Para ello se utilizaron los cebadores M13F y M13R, los cuales amplifican el fragmento descrito en el esquema de la figura 16, para comparar el tamaño del fragmento obtenido en un clon que contiene el plásmido sin inserto con el de los 95 clones escogidos previamente, colonia azul y blanca respectivamente; de acuerdo a la selección con el gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Se obtuvo un 20, 94 y 91 por ciento de clones positivos para las elusiones enriquecidas dos, tres y cuatro respectivamente (*vid* cuadro 10). Estos resultados apoyan la problemática que conlleva trabajar con microsatélites compuestos de repeticiones consecutivas de di- y trinucleótidos, mencionada anteriormente.

Figura 16

Esquema de localización de los cebadores M13F y M13R con respecto al inserto en el vector pGEMt easy



Cuadro 10

Resultados obtenidos en tamizaje por el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y por la reacción en cadena de la polimerasa

Elusión	Clones seleccionados por $\beta$ -galactosidasa	Clones seleccionados por PCR M13	
	No.	No.	Porcentaje
EE2	95	19	20
EE3	95	89	93.7
EE4	90	82	91.1
<b>TOTAL</b>	280	190	67.9

## B. Secuenciación de colonias positivas

Luego de la selección de los clones positivos por la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó un pre-análisis de secuenciación con el clon denominado E.3.13, que corresponde al clon número 13 de la elusión enriquecida tres. Como el tamaño del inserto clonado era pequeño se pudo identificar la secuencia parcial del microsatélite y no se obtuvo secuencia que lo flanqueara en el extremo cinco prima. Por consiguiente se secuenciaron únicamente los clones con un tamaño mayor o igual a 570 pares de bases de tal manera a obtener una secuencia que contuviera los dos ligadores SSNX (48 pares de bases), la secuencia correspondiente al plásmido (222 pares de bases) y un inserto de 300 pares de bases correspondiente a la secuencia del microsatélite completa y a la región flanqueadora.

De los 190 clones positivos por la reacción en cadena de la polimerasa, 84 tenían un tamaño mayor o igual a 570 pares de bases. En una primera fase, de estos 84 clones se escogieron al azar 10 muestras por elusión para secuenciarse. Sin embargo, durante la re-amplificación de las muestras se observó la pérdida de varios insertos, en particular, para la EE2. En forma global, de los 30 clones se logró reaislar un 80 por ciento, representando un 29, 33 y 38 por ciento de las elusiones dos, tres y cuatro respectivamente (*vid* cuadro 11).

Basándose en los resultados obtenidos hasta ahora se podría sugerir que las dificultades observadas en la EE2 se deben a los procedimientos realizados durante el enriquecimiento y a la naturaleza del ADN. No obstante, se tiene que tomar en cuenta que el número de insertos reaislados y la cantidad amplificada fue menor que durante la primera reacción en cadena de la polimerasa para las tres elusiones. Esto indica que los microsatélites en general poseen una naturaleza difícil de clonar, manifestada en una inestabilidad dentro del vector.

Cuadro 11

Eficiencia de reaislamiento de insertos en clones positivos de acuerdo a tamizaje por reacción en cadena de la polimerasa

Elusión	No. Clones positivos (tamizados por PCR)	Reaislamiento insertos por PCR			
		Positivo		Negativo	
		No.	Porcentaje con respecto al total de positivas (%)	No.	Porcentaje con respecto al total de negativos (%)
EE2	10	7	29	3	50
EE3	10	8	33	2	33
EE4	10	9	38	1	17
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>80</b>	<b>6</b>	<b>20</b>

Para sobreponer estos inconvenientes, se reislaron 84 clones positivos. Al percibir poca cantidad de ADN amplificado se realizó mayor volumen de reacción de PCR. Para eliminar bandas extras, presentes en la mayoría de los clones positivos, se redujo la sensibilidad de la enzima eliminando el cloruro de magnesio, se diluyó 1:10 la solución de bacteria lisada en agua para evitar el exceso de ADN templado y se restringió la amplificación inespecífica disminuyendo los ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación de 35 a 30. A pesar de optimizar la reacción de la PCR, únicamente amplificaron eficientemente 57 de los 84 clones. Esto implicó la pérdida del 32 por ciento de los insertos clonados, por lo que se recomienda la utilización de vectores que proporcionen una mayor estabilidad al inserto; por ejemplo el uso de una cepa de bacterias con una baja capacidad de recombinación, como las bacterias Sure, que tienen mutados los genes RecB y Rec C, que codifican para las enzimas de recombinación o la utilización de vectores con un número de copias bajo, con lo que también se minimiza la posibilidad de recombinación.

Finalmente se secuenciaron 44 de los 57 clones positivos recuperados. De los 44, la reacción de secuenciación de dos clones no funcionó y las secuencias de los clones E.3.6 y E.3.14 fueron idénticas, con lo que la identificación de microsatélites se hizo a partir de 40 secuencias. En el anexo D se reportan las secuencias registradas de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. No obstante, de los 44 clones secuenciados, el 25% correspondía a la EE2, el 34% correspondía a la EE3 y el 41% correspondía a la EE4.

Al realizar la búsqueda de genes entre los clones secuenciados, se eliminaron nueve secuencias, de las cuales, cuatro correspondían al mismo gene. En el apéndice E se registraron estas secuencias junto con su número de acceso en el banco de genes y el gen correspondiente.

Dentro de las 32 secuencias restantes se identificaron manualmente los posibles microsatélites presentes. La elección de estos últimos se restringió a aquellos casos en los cuales la repetición consecutiva se repetía por lo menos ocho veces ya que, de acuerdo a lo descrito por Oliveira *et al.*, esto aumenta la probabilidad que los microsatélites sean polimórficos. Basándose en esta regla se identificaron once microsatélites (*vid* cuadro 12).

Cuadro 12

## Microsatélites identificados manualmente en los clones secuenciados

Microsatélite identificado en clon	Microsatélite identificado	Tipo de microsatélite
E.4.72	(AG) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (AG) <sub>7</sub>	Interrumpido
E.3.6 = E.3.14	(TG) <sub>10</sub>	Perfecto
E.4.43	(ACA) <sub>8</sub>	Perfecto
E.3.8	(ATGT) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (ATGT) <sub>7</sub>	Interrumpido
E.2.9	(TC) C (TC) <sub>3</sub> N <sub>2</sub> (TC) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (TC) N <sub>4</sub> (TC)	Interrumpido

Microsatélite identificado en clon	Microsatélite identificado	Tipo de microsatélite
E.3.16	(AG) <sub>7</sub> C (AG) <sub>2</sub>	Imperfecto
E.2.28	(TGA) <sub>2</sub> N <sub>10</sub> (TGA) <sub>4</sub> N <sub>3</sub> (TGA)	Interrumpido
E.4.40	(CT) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (CT) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (CT) <sub>4</sub> N <sub>4</sub> (CT) <sub>2</sub> N (CT)	Interrumpido
E.4.39	(GA) <sub>8</sub> N (GA)	Interrumpido
E.3.27	(TG) <sub>3</sub> N <sub>6</sub> (GTAT) <sub>5</sub>	Compuesto interrumpido
E.4.51	(GA) <sub>8</sub>	Perfecto

### C. Diseño de cebadores y amplificación de microsatélites mediante reacción en cadena de la polimerasa

A partir de las secuencias de los microsatélites identificados se diseñaron cebadores con el programa Primer3. En las secuencias de los clones E.3.27 y E.4.51 no se logró obtener un par de cebadores que se ajustaran a los parámetros utilizados, por lo que únicamente se diseñaron nueve pares de cebadores (*vid* cuadro 13). Anticipando su uso en el secuenciador automático, los cebadores *forward* se marcaron con los fluoróforos Fam (6-carboxifluoresceína) y Hex (hexaclorofluoresceína) en el extremo cinco prima de la secuencia del cebador.

Cuadro 13

Diseño de cebadores para secuencias de microsatélites identificados para el *Trypanosoma cruzi*

Microsatélite	ID	Secuencia de cebador	Marcaje en extremo 5'	Tm (°C)	Fragmento esperado (pb)
E.4.39	MS1	F TGCGGGTTTCTATGAAATTCT R TTGCTTTTCAACCAAATAAGGA	Fam Ninguno	59	163
E.4.40	MS2	F TCCGGCTGAAAAGAATCATC R AAGGGGGAAAGGAAAACAA	Hex Ninguno	60	207
E.3.6 =E.3.14	MS3	F CGCTGGAGAAGAGGCAATAC R ATTCATATTTGCCGACGTCA	Fam Ninguno	60	192
E.2.9	MS 4	F CGTTGATGAAGAGGAGCACA R TCACCCAAGGAACTGAAAGG	Hex Ninguno	60	218
E.4.43	MS5	F CTTTAGGCTTGACGCACCTC R GTGTTTGTGCTGGTCGATA	Hex Ninguno	60	235
E.4.72	MS6	F ACACATGTGAGGTGGTGGAA R CCTCGCCACTTATCCAAATG	Hex Ninguno	60	240
E.3.16	MS8	F TACTATCACCGTGGCAGCAA R TGCCACGGAAAAATAACACA	Hex Ninguno	60	279

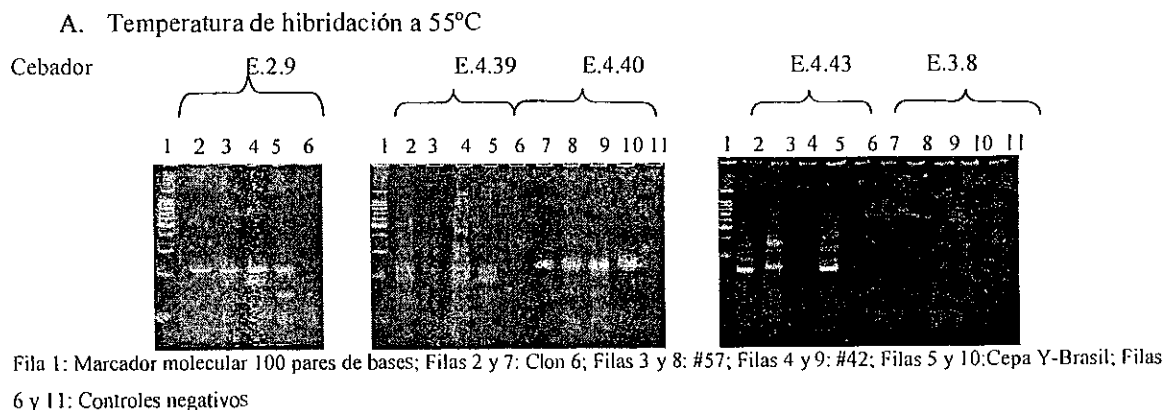
Microsatélite	ID	Secuencia de cebador	Marcaje en extremo 5'	Tm (°C)	Fragmento esperado (pb)
E.3.8	MS9	F GCCCATTTGGCACTATTTCTT R AATCATGGGATCGAAGAACG	Fam Ninguno	59	199
E.2.28	MS10	F CGTCAATGAAGTCGGTTGTG R GCACACACATGGGCGTATAA	Fam Ninguno	60	168

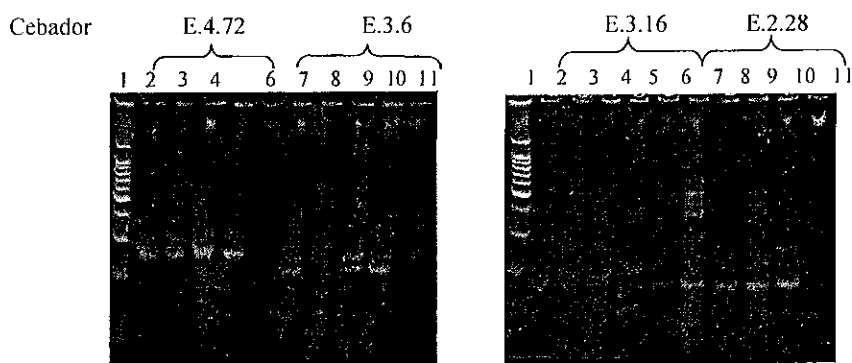
F: cebador forward; R: cebador reverse; Hex y Fam fluoróforos incorporados al extremo cinco prima de la secuencia.

Basándose en la temperatura de fusión de los cebadores, se diseñó un programa de PCR de cuatro bloques para amplificar los microsatélites identificados: desnaturalización inicial, hibridación, elongación, desnaturalización y elongación final. En el último bloque se esperaba que la reacción de adición de una adenina al fragmento amplificado por parte de la polimerasa fuera total, con lo cual se minimizó uno de los artefactos creados por la enzima. La temperatura de hibridación inicial utilizada fue de 55°C, que correspondía a cinco grados celsius menos de la temperatura de fusión (Tm por sus siglas en inglés *melting temperature*), según lo recomendado por el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Northwestern. Se utilizó el mismo programa para todos los pares de cebadores, incluso en casos en los cuales la temperatura de fusión era de 59°C y no de 60°C. La especificidad y cantidad de ADN amplificado se analizó corriendo los productos de PCR en una gel de poliacrilamida. Al trabajar a 55°C amplificaron ocho pares de cebadores, en los cuales se observó una especificidad aceptable ya que la intensidad y número de bandas extras fue mínimo (*vid* figura 17A). Sin embargo, para eliminar las bandas no específicas se aumentó la temperatura de hibridación a 57°C y se repitió la PCR amplificando las muestras clon6 y Y-Brazil con los pares de cebadores E.4.43, E.2.9 y E.3.6; ya que fueron los que mejor amplificaron a 55°C. Como se observa en la figura 17B, la muestra Y-Brasil no amplificó con el cebador E.4.43 y amplificó levemente con el cebador E.3.6 a 57°C; mientras que el resto de muestras amplificó aproximadamente con la misma eficiencia. A partir de este resultado se decidió mantener la temperatura de hibridación a 55°C.

Figura 17

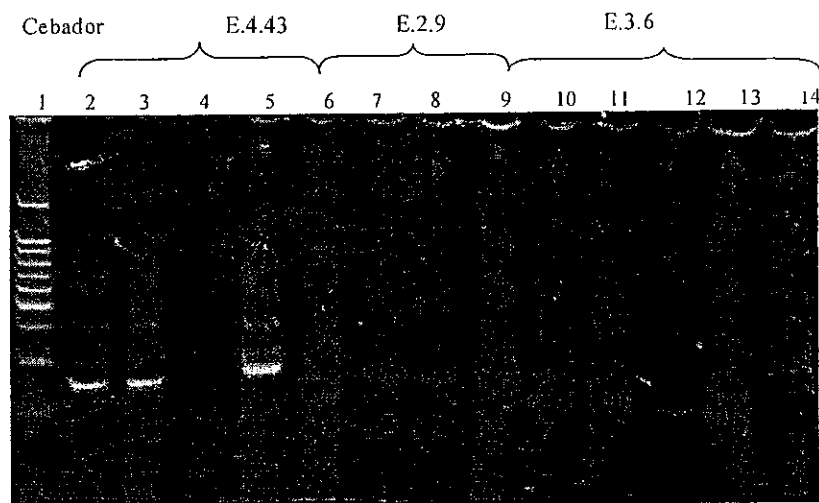
Microsatélites amplificados en aislados de *T. cruzi* al utilizar pares de cebadores diseñados bajo dos condiciones de temperatura de hibridación





Fila 1: Marcador molecular 100 pares de bases; Filas 2 y 7: Clon 6; Filas 3 y 8: #57; Filas 4 y 9: #42; Filas 5 y 10: Ceba Y-Brazil; Filas 6 y 11: Controles negativos

#### B. Comparación de calidad de amplificación a temperaturas de hibridación 55°C y 57°C



Fila 1: Marcador molecular 100 pares de bases; Fila 2: Clon 6 a 57°C; Fila 3: Clon 6 a 55°C; Fila 4: Y-Brazil a 57°C; Fila 5: Y-Brazil a 55°C; Fila 6: Clon 6 a 57°C; Fila 7: Clon 6 a 55°C; Fila 8: Y-Brazil a 57°C; Fila 9: Y-Brazil a 55°C; Fila 10: Clon 6 a 57°C; Fila 11: Clon 6 a 55°C; Fila 12: Y-Brazil a 57°C; Fila 13: Y-Brazil a 55°C; Fila 14: Control negativo.

#### D. Análisis de microsatélites por electroforesis capilar

Una vez optimizada la reacción en cadena de la polimerasa para los nueve pares de cebadores diseñados, se prosiguió con la amplificación y la optimización de la corrida del producto de PCR en el secuenciador automático ABI 3100.

Lo primero que se optimizó fue la cantidad de producto de PCR a montar en el equipo. Para esta prueba, se utilizó ADN de *T. cruzi* aislado de triatominos recolectados en áreas endémicas en los casos de Guatemala y Panamá; aislado de seres humanos para Brasil y aislado de mamíferos en lo que respecta a

Ecuador. Para esta optimización se escogieron al azar dos muestras de cada país en estudio; y se montaron en el equipo puras y diluidas diez veces. Para identificar las muestras analizadas en este caso referirse al cuadro 14. Para determinar cuál concentración del producto de PCR era la óptima, se tomó en cuenta el número de picos esperados detectados y la altura de éstos. Como se observa en el cuadro 14, en el caso de Guatemala, el número de picos esperados amplificadas entre las dos concentraciones no difiere; y la altura de los picos obtenidos al diluir la muestra se encuentra en un mejor rango de lectura. Por el contrario, para Panamá, Ecuador y Brasil, la cifra de picos no detectados por muestra, al correr el producto diluido, es menor o igual al observado al montar el producto de PCR puro. A partir de este ensayo se decidió diluir diez veces el producto de PCR correspondientes a todas las muestras a analizar de Guatemala y utilizar el producto de PCR puro para todas las muestras a analizar originarias de Panamá, Ecuador y Brasil.

Los resultados obtenidos en la prueba anterior permitieron también hacer un pre análisis del grado de polimorfismo de los pares de cebadores diseñados al registrar el número y variedad de alelos amplificados por muestra. Al analizar estos datos, se determinó que los microsatélites MS4 y MS8 mostraron un monomorfismo al amplificar un sólo tamaño de alelo en todas las muestras. Debido a este resultado, se decidió eliminar estos dos microsatélites.

Cuadro 14

## Optimización de reacción de corrida en equipo de electroforesis capilar

Muestra Microsatélite	YB (Brasil)		Can 3 (Brasil)		6320 (Ecuador)		6326 (Ecuador)		1510 (Panamá)		1541 (Panamá)		57 (Guatemala)		152 (Guatemala)	
	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro	Dil 1:10	Puro
MS1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
MS2	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
MS3	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
MS4	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
MS5	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
MS6	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
MS8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
MS10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TOTAL	2	4	7	8	8	8	1	1	7	8	1	7	7	8	8	7

(+) si amplificó (-) no amplificó

Una vez optimizada la concentración del producto de CR a montar en el equipo, se analizó el polimorfismo de los seis microsatélites restantes. Para ello se escogieron trece muestras originarias de Guatemala, correspondiendo a dos aislados de cada departamento endémico; una muestra de Panamá; una muestra de Ecuador y una muestra de Brasil. Para ver la identificación de estos aislados referirse a cuadro 15. En este examen se registraron los picos esperados y se clasificaron como polimórficos los

microsatélites en los cuales se observaba más de un alelo entre las muestras escogidas. Este mecanismo se apoya en los estudios de Blackston *et al.*, quienes determinaron que los locus analizados para el microorganismo *Toxoplasma gondii* eran polimórficos si se registraba más de un alelo. Con esta prueba, se observó que el MS2 presenta, además de un monomorfismo, un alto grado de alelos nulos; lo que puede indicar una mutación en el sitio de unión de los cebadores; que el MS1 muestra un polimorfismo únicamente en una rango amplio, Sur América contra Centro América, y que el MS6 despliega un leve grado de polimorfismo dentro de Guatemala, aunque va aumentando al alejarse geográficamente; que el MS10 indica un polimorfismo similar a lo largo de los países; mientras que los MS3 y MS5 parecen ser polimórficos en un rango geográfico pequeño, dentro de Guatemala (*vid* cuadro 15). Por consiguiente se descartaron los microsatélites MS1 y MS2.

Cuadro 15  
Determinación preliminar de polimorfismo en microsatélites  
MS1, MS2, MS3, MS5, MS6 y MS10

Muestra	Origen		Alelos amplificados (pb)					
	País	Departamento	MS1	MS2	MS3	MS5	MS6	MS10
10	Guatemala	Zacapa	161	206	190	231, 236	240, 241	155, 169
14	Guatemala	Zacapa	161	206	231	230, 231	240, 241	156, 169
24	Guatemala	Chiquimula	161	206	190,231	230,236	240	155, 169
82	Guatemala	Chiquimula	161	Na	190	230, 236	Na	155, 169
46	Guatemala	Sta. Rosa	161	206	190,251	235,236	240	156, 169
35	Guatemala	Sta. Rosa	161	Na	190	230	240	169
52	Guatemala	Jutiapa	161	206	190,231	230, 236	240	169
60	Guatemala	Jutiapa	161, 163	Na	190	230	240	156, 169
66	Guatemala	Jalapa	161	Na	186, 190	231	241	155, 169
59	Guatemala	Jalapa	Na	Na	Na	Na	Na	169
122	Guatemala	Baja Verapaz	161	Na	190	230, 236	240	169
116	Guatemala	Baja Verapaz	161	Na	190,221	230	240, 242	155, 169
126	Guatemala	Baja Verapaz	161	Na	190	230, 236	240	155, 169
1558	Panamá	Ñaju, Chilibre	161	206	Na	Na	240	169
6303	Ecuador	Manabí	161 y 163	206	178, 241	237	236, 237	156, 170
Can 3	Brasil	Pará	163	Na	186	232	244	156, 169

Na: No amplificó

Se realizó una última prueba para establecer la especificidad de los microsatélites analizados para diferenciar entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Estipular esta capacidad es indispensable, ya que generalmente los triatomíneos están coinfectados por ambos parásitos. Para ello, se detectó la amplificación o no de fragmentos con dos muestras correspondientes a ADN de *T. rangeli* corridas en el secuenciador automático. Para ver la identificación de estos aislados referirse a cuadro 16. Las muestras examinadas se definieron como *T. rangeli* basándose en el tamaño de los fragmentos obtenidos con los

cebadores S35 y S36. Este par de cebadores amplifica las regiones conservadas de los minicírculos del ADN del kinetoplasto o kADN. En el caso del *T. cruzi* el tamaño del fragmento amplificado corresponde a 330 pares de bases, mientras que en el *T. rangeli* se observa el fragmento típico de 760 pares de bases, derivado de minicírculos de kDNA con dos regiones conservadas, y un conjunto de fragmentos heterogéneos cuyos tamaños varían de 300 a 470 pares de bases, derivados de minicírculos con cuatro regiones conservadas (Vallejo *et al.*, 1999).

Como se observa en el cuadro 16, de los cinco locus analizados únicamente el correspondiente al MS10 presenta una amplificación en ambas muestras. Este resultado implica la inespecificidad de este locus para el *Trypanosoma cruzi*, por lo que se decidió descartarlo del estudio. Luego de este ensayo los análisis posteriores se restringieron a los microsatélites MS1, MS3, MS5 y MS6.

Cuadro 16

Detección de fragmentos amplificados por MS1, MS3, MS5, MS6 y MS10 en el secuenciador automático

Muestra	Amplificación de fragmentos				
	MS1	MS3	MS5	MS6	MS10
16	No	No	No	No	Si
17	No	No	No	No	Si

Para los análisis estadísticos se escogieron 25 muestras de Guatemala, ocho de Panamá, seis de Ecuador y cuatro de Brasil (*vid electroferogramas en Anexo F*). La determinación del polimorfismo de los microsatélites se restringió a 43 muestras, ya que en varios estudios de diversidad genética el número de muestras es pequeño, hasta de 20 muestras (Blackstone *et al.*, 2001). Para seleccionar las muestras de Guatemala se tomó al azar cuatro de cada uno de los seis departamentos endémicos y se realizó la PCR S35 y S36 para asegurarse que las muestras fueran *T. cruzi*. Para el departamento de Jalapa sólo había tres muestras, por lo que se agregó una muestra más al departamento de Chiquimula y se tomó la muestra H7, aunque pertenezca a Santa Rosa, como aparte ya que proviene de un ser humano. Dentro de cada departamento se intentó elegir muestras que estuvieran geográficamente alejadas una de las otras. En el cuadro 8 y figura 13, en la sección de materiales y métodos, se observa la identificación y localización geográfica de cada una de las muestras elegidas.

El registro de los fragmentos amplificados y detectados por el secuenciador automático fue el primer procedimiento que se llevó a cabo. Para minimizar el error involucrado al utilizar muestras no clonadas se establecieron las siguientes reglas: Se trabajó el parásito como un organismo diploide de acuerdo a lo descrito por Oliveira *et al.* y al número de alelos por muestra amplificados en los aislados de Guatemala

con los microsatélites descritos por Oliveira *et al*, no eran mayor a dos (comunicación personal Pamela Pennington).

En un segundo punto, se determinó la razón altura contra área del pico correspondiente al fragmento amplificado. Se supuso que aquellos alelos que tuvieran el mismo valor pertenecían a un mismo parásito, tomando como referencia la razón altura contra área del pico con mayor intensidad. En el caso que más de dos alelos se ajustaran al patrón anterior se admitió lo siguiente: si estaban en un mismo grupo se tomaron como dos alelos reales cuando el fragmento de mayor tamaño, en pares de bases, tenía una intensidad igual o mayor al cincuenta por ciento del pico consecutivo de menor tamaño. Cabe mencionar que se observó la presencia de alelos contiguos al predominante con una altura mucho menor a la aceptada. De acuerdo a Wang *et al*. ésto puede deberse a un polimorfismo interno en la secuencia del sitio de unión de los cebadores, reduciendo la afinidad con cebador y provocando una producción baja del alelo correspondiente. Para poder corroborar esta deducción es necesario secuenciar el alelo respectivo. Debido a la rigidez de las reglas es posible que el grado de polimorfismo detectado sea menor al real ya que Gaunt *et al*. registraron como alelo real uno que tenía una altura correspondiente al 30% del alelo predominante. En el caso de haber dos grupos de picos se tomó el alelo de mayor intensidad de cada grupo. Finalmente se descartaron todos los alelos cuyo tamaño fuera menor a 110 pares de bases, ya que de acuerdo a estudios en *T. dimidiata* la amplificación de estos fragmentos corresponde a la dimerización de los cebadores *forward* y *reverse* o a artefactos no repetibles de la enzima polimerasa (Comunicación personal Cynthia Ralda).

En el apéndice G se presenta los alelos seleccionados en las 43 muestras en los locus correspondientes a los microsatélites MS3, MS5 y MS6. Cabe mencionar que en microsatélite MS3 las muestras de Guatemala presentaron la amplificación de dos grupos de alelos que difirieron hasta por 32 pares de bases. Esto puede representar ya sea un minisatélite o dos locus distintos. Debido a ello, las muestras de Guatemala se analizaron paralelamente tomando en cuenta y eliminando, en el locus MS3, los fragmentos mayores a 198 pares de bases. Al tomar en cuenta los alelos mayores a 198 pares de bases, el análisis se denominó MS3 completo y al eliminarlos se le llamó MS3 parcial.

Basándose en la amplificación de picos esperados en una misma muestra con razones altura contra área diferentes, la presencia de un porcentaje promedio de 57 por ciento de muestras con una mezcla de parásitos (*vid* cuadro 17). Esta mezcla se presenta incluso en la muestra clonada en el laboratorio en el locus correspondiente al microsatélite MS5; por lo que es posible que la clonación no hay sido eficiente. La razón altura contra área parece ser un método confiable ya que los alelos que difieren en un par de bases, en una misma muestra, poseen valores de razón distintos. Además, en el 45 por ciento de los casos, los tres microsatélites concuerdan en la presencia de mezclas en las muestras. Para evitar este tipo de problemas es recomendable utilizar muestras clonadas.

Cuadro 17

Porcentaje de muestras con mezcla de parásitos de acuerdo a razón altura contra área de pico amplificado para cada microsatélite y en conjunto

Microsatélite	Porcentaje muestras mezcla (%)	Mezcla detectada	No. Muestras	Porcentaje
MS3	47	1 microsatélite	5	16
MS5	65	2 microsatélites	12	39
MS6	58	3 microsatélites	14	45
Promedio	57	TOTAL	31	100

## E. Análisis genético de los microsatélites

En este estudio se trabajó con los aislados de Guatemala, Panamá, Ecuador y Brasil. No obstante, se debe tomar en cuenta que los aislados obtenidos de Guatemala provienen de *T. dimidiata*, los de Panamá provienen de *T. pallencens*, los de Ecuador de mamíferos reservorios y los de Brasil de humanos. Los distintos orígenes de los aislados han sido utilizados en varios análisis anteriores, implicando que, posiblemente, no es tan significativo. Sin embargo, se esperaría que el polimorfismo obtenido en las muestras de Guatemala, Panamá y Ecuador sea mayor, en comparación con las de Brasil, ya que el parásito está mejor adaptado a los triatomínicos y a los mamíferos reservorios que al hombre.

A partir del registro de alelos reales en las tres poblaciones se analizó el polimorfismo de los tres microsatélites por medio de la determinación de la frecuencia alélica, del número efectivo de alelos y de la heterocigosidad observada. Estos parámetros se calcularon con el programa para genética de poblaciones GenA1Ex, versión 5.04. Además, se determinó la distancia genética entre individuos basándose en la similitud de Nei Li (S), programando la fórmula en el programa R, y se construyó el dendrograma mediante el método jerárquico de aglomeración, *agglomerative nesting*, AGNES, por sus siglas en inglés.

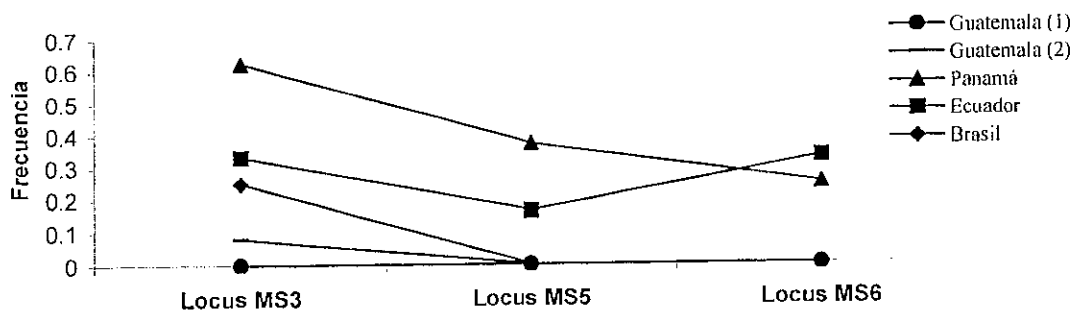
### 1. Frecuencias alélicas de los individuos estudiados. En Panamá, Ecuador y

Brasil se encontraron tres individuos con alelos nulos en los tres microsatélites. Estos individuos no se tomaron en consideración para el análisis de las frecuencias alélicas. La no-amplificación se puede deber a una mala calidad o baja cantidad de ADN templado durante la PCR. También se encontraron muestras con alelos nulos para uno o dos microsatélites; éstas se tomaron en cuenta para el análisis de la frecuencia de alelos nulos pero no se consideraron durante la determinación de la frecuencia alélica (*vid* apéndice G).

En la gráfica 1 se observa que Panamá posee la mayor frecuencia de alelos nulos en los locus MS3 y MS5, Ecuador posee aproximadamente la misma frecuencia de estos alelos en los tres microsatélites y Brasil los presenta únicamente en el locus MS3. La presencia de alelos nulos en el locus MS3 en los cuatro países puede indicar que el sitio de unión de los cebadores esté sufriendo mutaciones, impidiendo así, la amplificación de los fragmentos en la PCR. Por otra parte, la presencia de alelos nulos en las muestras de Guatemala, al eliminar los fragmentos mayores a 198 pares de bases, puede revelar cierta competencia entre los dos posibles locus por su amplificación en la PCR.

Gráfica 1

## Frecuencia de alelos nulos por microsatélite y por país

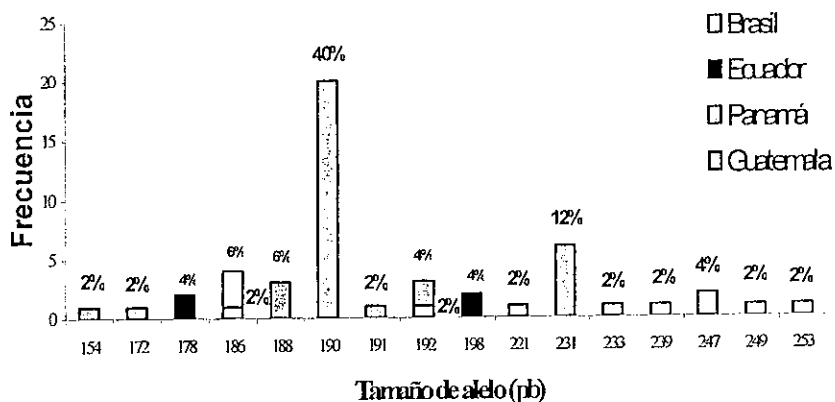


Guatemala (1): muestras de Guatemala tomando MS3 completo. Guatemala (2): muestras de Guatemala tomando MS3 parcial.

La gráfica 2 representa el histograma con las frecuencias alélicas absolutas del locus MS3 completo para todos las poblaciones en estudio. Se observa aproximadamente una distribución continua de los alelos con tamaños desde 154 a 198 pares de bases por un lado y desde 221 a 253 pares de bases por otro. Los dos alelos predominantes fueron aquellos cuyo tamaño fue de 190 y 231 pares de bases, ambos presentes únicamente en Guatemala. Además se observa que sólo hay dos alelos compartidos entre los países (Brasil con Guatemala y Panamá con Guatemala). Tal resultado puede indicar que los aislados obtenidos en Ecuador están más alejados genéticamente. La presencia de un sesgo hacia los alelos de mayor peso molecular indica que hay más mutaciones de adición que de delección. En el histograma se observa con mayor claridad la presencia de una discontinuidad entre alelos consecutivos de hasta 23 pares de bases. Como se mencionó en el inciso anterior, esto puede deberse, ya sea a la naturaleza de minisatélite del locus o a la amplificación inespecífica de un segundo locus. Sin embargo, el hecho que únicamente las muestras de Guatemala presenten estos alelos apoya la segunda explicación.

Gráfica 2

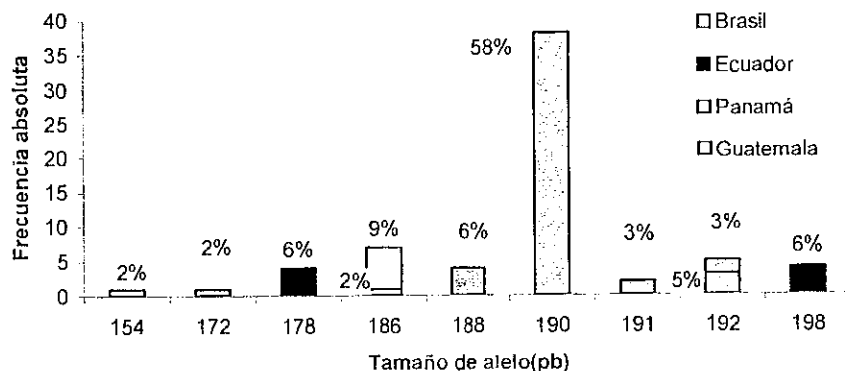
Frecuencia alélica en locus MS3 completo por país



El histograma correspondiente al análisis de las muestras del locus MS3 parcial se observa en la gráfica 3. Esta muestra una distribución continua de alelos desde 154 hasta 198 pares de bases, con un máximo en 190 pares de bases. Contrariamente al histograma de la gráfica 2, existe un sesgo hacia fragmentos con bajo peso molecular, lo cual podría revelar una tendencia hacia las mutaciones de delección. Este comportamiento podría significar que el locus alcanzó su tamaño máximo y está iniciando su destrucción.

Gráfica 3

Frecuencia alélica en locus MS3 parcial por país

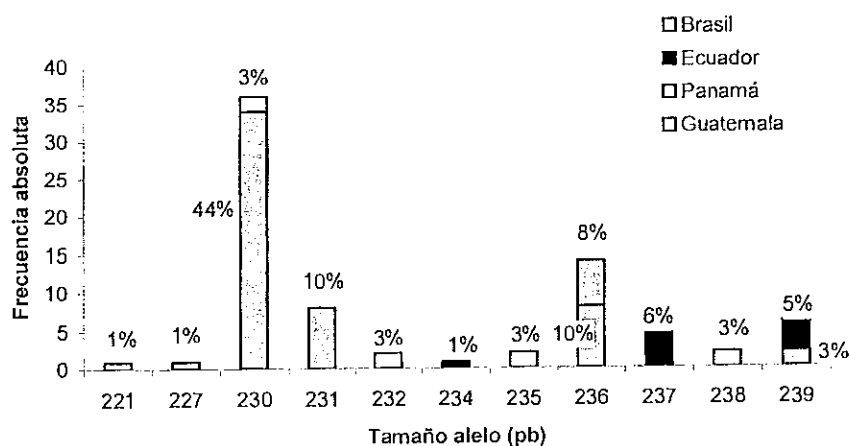


En la gráfica 4 se muestra el histograma de frecuencias alélicas absolutas para las cuatro poblaciones en el microsatélite perfecto MS5. Al igual que en locus MS3, las frecuencias alélicas se distribuyen de forma continua desde 221 hasta 239 pares de bases, con máximos en 230 y 236 pares de bases, presentes en Guatemala, Panamá y Brasil. Al igual que en el locus MS3, existen dos alelos compartidos entre países (Brasil con Guatemala y Panamá con Guatemala). Además Ecuador y Panamá presentan un alelo en

común. Esto puede apoyar la idea que las muestras de Ecuador son distintas al resto y que Panamá, posiblemente por razones geográficas, es el más cercano genéticamente a Guatemala. A diferencia del MS3, el mayor salto entre alelos consecutivos es de seis pares de bases, múltiplo de tres, lo cual concuerda con la naturaleza de las repeticiones del microsatélite (trinucleótido). No obstante hay que tomar en cuenta que no todos los alelos son múltiplos de tres, probablemente, debido a la presencia de alguna inserción o deleción, indel, en la secuencia flanqueante al microsatélite o dentro del microsatélite en sí. El sesgo que se observa en la distribución hacia los fragmentos de mayor masa molecular podría indicar que las mutaciones positivas imperan sobre las deleciones.

Gráfica 4

## Frecuencia alélica en locus MS5 por país



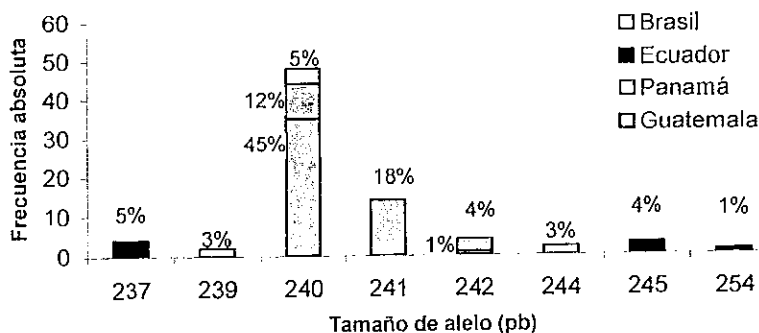
En las gráficas 5A y 5B se muestran los histogramas de las frecuencias alélicas absolutas del locus MS6, tomando en cuenta el alelo 241 y convirtiendo este alelo a 240 pares de bases respectivamente. Esta corrección del alelo 241 se realizó ya que éste puede representar el artefacto de la PCR mediante la cual la ADN polimerasa agrega una adenina al fragmento real, que en este caso, sería el 240. Por otro lado, como este alelo sólo está presente en las muestras de Guatemala, la presencia de éste se puede haber debido a la formación de una estructura secundaria en el alelo desnaturalizado durante la corrida en el equipo de electroforesis capilar (Bull *et al.*, 1999). En ambos casos, se observa una distribución continua de los alelos desde 237 hasta 254, con máximos en 240 y 241 pares de bases en el caso de la gráfica 5A; y en 240 pares de bases en la 5B. En este caso existe un alelo compartido por Guatemala, Panamá y Brasil; y otro por Guatemala y Panamá. Esto corrobora lo advertido en los dos microsatélites anteriores: una mayor similitud genética entre las poblaciones de Guatemala, Panamá y Brasil; y una mayor distancia con las muestras de Ecuador. El sesgo hacia los alelos de mayor masa molecular también revela una predominancia de las mutaciones de adición contra las de deleción. Es en este microsatélite donde se

encuentra el menor número de alelos, ocho, por lo que se podría suponer que el grado de polimorfismo es el menor.

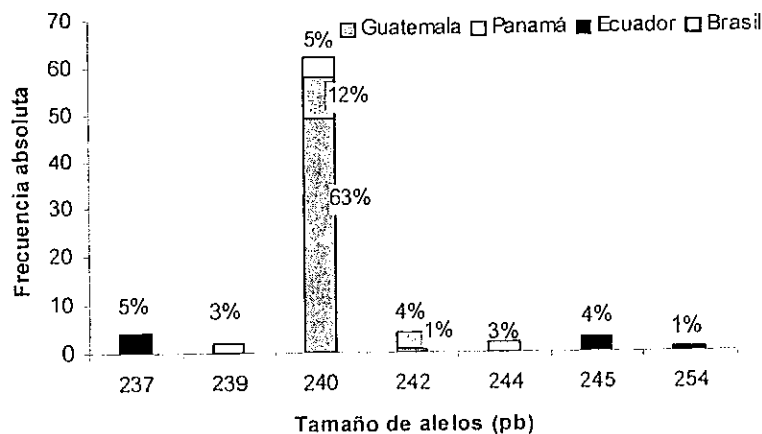
Gráfica 5

## Frecuencia alélica en locus MS6 por país

## A. Frecuencia alélica en locus MS6 por país



## B. Frecuencia alélica en locus MS6 (corrigiendo alelo) por país



La frecuencia del alelo predominante en los tres locus varía de 0.58 a 0.98 en Guatemala, de 0.60 a 0.75 en Panamá, de 0.25 a 1.0 en Brasil y es de 0.50 en Ecuador. De acuerdo a la regla del 0.95 de Hartl y Clark, los tres microsatélites son polimórficos en todos los países ya que la frecuencia del alelo predominante no sobrepasa el 0.99. En el caso de Guatemala, la frecuencia del alelo predominante correspondiente a 0.98 corresponde al locus MS6. Esto podría indicar que este microsatélite posee menos polimorfismo que los otros dos. La excepción de la regla se encuentra en el locus MS3 para los aislados de Brasil ya que se observó un alelo único en la población, es decir, una frecuencia de 1.0. En este caso, el origen de los aislados, un ser humano, es posiblemente la explicación. El grado de adaptación del parásito

en el hombre es menor que en los triatomínicos y mamíferos reservorios. Además, dentro del ser humano el parásito sufre una selección natural que se traduce en la eliminación de la mayoría de las cepas. Por ende se espera que la variabilidad genética presente en el hombre sea menor. No obstante, el hecho que en los dos locus restantes, Brasil presente la frecuencia más baja para su alelo predominante puede sugerir que el resultado observado para el locus MS3 se deba a la posible presencia de alelos nulos; las tres muestras fueron homocigotas.

Los patrones obtenidos con las frecuencias alélicas de los fragmentos amplificados con los tres loci no muestran una distribución normal perfecta, ya que existen saltos mayores a la unidad repetitiva entre alelos consecutivos. Este tipo de perfiles podría indicar que el modelo apto para estos microsatélites es el de alelos infinitos; éste propone la creación de alelos nuevos que varían, de su pariente más cercano, por más de una unidad repetitiva. Contrariamente al modelo de mutación paso a paso, el cual indica que los alelos nuevos provienen de un ancestro con una repetición más o menos.

Para poder comparar el número de alelos entre los países se calculó el número de alelos efectivos o  $N_e$ . Como se observa en el cuadro 18, los valores indican que el grado de diversidad depende del locus ya que, mientras que Guatemala presenta el mayor número de alelos en el locus MS3, Panamá y Ecuador lo tienen en el locus MS5 y Brasil en el locus MS6. Por otro lado, al comparar el número de alelos absolutos con los efectivos, se advierte que únicamente para el locus MS3 en la población de Guatemala, en el caso de tomar en cuenta los fragmentos mayores a 198 pares de bases (Guatemala 1), hay una variación muy marcada (13 contra 2.7). Esto implica que el grado de polimorfismo es bajo, ya que sólo se requerirían tres alelos con una misma frecuencia para tener la homocigosidad observada. Por otro lado, hay que observar que al eliminar del análisis los fragmentos mayores a 198 pares de bases en el locus MS3, la diferencia entre el número de alelos y el de alelos efectivos en las muestras de Guatemala (Guatemala 2) sigue siendo alto (6 contra 1.4). No obstante, el hecho que el número de alelos efectivos se asemeje más al resto de países en el caso del MS3 puede apoyar la idea de la amplificación no deseada de un segundo locus en las muestras de Guatemala.

En lo que respecta al locus MS6, la corrección del alelo 241 a 240 implica un aumento de la frecuencia del alelo predominante a 0.70 a 0.98 para Guatemala. Este valor puede indicar que el grado de polimorfismo de este microsatélite es bajo para las muestras de Guatemala, ya que el alelo predominante que le sigue en cuanto a frecuencia corresponde a un valor de 0.75 (Panamá). El hecho que Guatemala tenga siempre el mayor valor en cuanto a la frecuencia del alelo predominante, puede indicar que los aislados de este país son más homogéneos, y por ende, menos polimórficos que en el resto de los países analizados. Una posible causa es la domesticación de las chinches de donde se aislaron los parásitos.

Cuadro 18  
Diversidad genética por locus y por país  
(GenAEx, 2002)

País	Locus MS3						
	Número de individuos	Número de alelos	Número de alelos efectivos	Frecuencia alelo predominante	Alelos nulos	<sup>†</sup> Ho	<sup>‡</sup> He
Guatemala (1)	25	13	2.747	0.58	0	0.56	0.64
Guatemala (2)	23	6	1.449	0.826	2	0.130	0.310
Panamá	3	2	1.800	0.667	5	0.667	0.444
Ecuador	4	2	2.000	0.500	2	0.000	0.500
Brasil	3	1	1.000	1.000	1	0.000	0.000
*Todos	10	5	4.54	0.200	8	0.200	0.780

Guatemala (1): Análisis de muestras con MS3 completo. Guatemala (2): Análisis de muestras MS3 parcial

País	Locus MS5						
	Número de individuos	Número de alelos	Número de alelos efectivos	Frecuencia alelo predominante	Alelos nulos	<sup>†</sup> Ho	<sup>‡</sup> He
Guatemala	25	3	1.947	0.68	0	0.32	0.49
Panamá	5	4	2.381	0.60	3	0.4	0.58
Ecuador	5	3	2.381	0.50	1	0.2	0.58
Brasil	4	4	4	0.25	0	0	0.75
*Todos	14	10	6.759	0.214	4	0.214	0.852

País	Locus MS6						
	Número de individuos	Número de alelos	Número de alelos efectivos	Frecuencia alelo predominante	Alelos nulos	Ho	He
Guatemala (1)	25	3	1.857	0.70	0	0.04	0.43
Guatemala (2)	25	2	1.041	0.98	0	0.040	0.039
Panamá	6	2	1.6	0.75	2	0.5	0.38
Ecuador	4	3	2.462	0.50	2	0.25	0.59
Brasil	4	3	2.667	0.50	0	0	0.63
*Todos	14	7	3.698	0.464	4	0.286	0.730

Guatemala (1): Análisis del locus MS6 tomando en cuenta el alelo 241. Guatemala (2): Análisis de locus MS6 convirtiendo el alelo 241 en 240 pb.

<sup>†</sup>Ho: heterocigosidad observada; <sup>‡</sup>He: heterocigosidad esperadas; \* Todos: las muestras de Panamá, Ecuador y Brasil

A partir de los datos promedios obtenidos en los tres locus, se podría decir que estos locus presentan un mayor polimorfismo para la población de Panamá, ya que posee un valor de heterocigosidad observada marcadamente mayor al resto (*vid* cuadro 19). En el caso de estar amplificando un minisatélite en el locus MS3 en las muestras de Guatemala, el valor de la heterocigosidad observada también es alto en relación con Ecuador y Brasil. Sin embargo, al suponer la amplificación no-deseada de un segundo locus, en el microsatélite MS3 el valor de heterocigosidad observada en Guatemala baja considerablemente (de 0.31 a 0.16). No obstante, el bajo grado de heterocigosidad es esperado. Por otro lado, cabe mencionar que

Panamá presenta una heterocigosidad observada promedio muy similar a la esperada. Esto podría deberse a un tamaño de muestra muy pequeño, lo cual implicaría una no-representatividad. También existe la posibilidad que el programa GenAlEx sea inexacto en el caso de existir una frecuencia de alelos nulos alta, lo cual concuerda con Panamá, sobre todo para el MS3 (comunicación personal Pamela Pennington). Además, como el número de alelos efectivos es aproximadamente el mismo en los cinco casos, se podría suponer que el grado de polimorfismo a lo largo de las muestras es similar, por lo que la idea de un error en las muestras de Panamá es muy posible (*vid* cuadro 18 y gráfica 6).

Cuadro 19

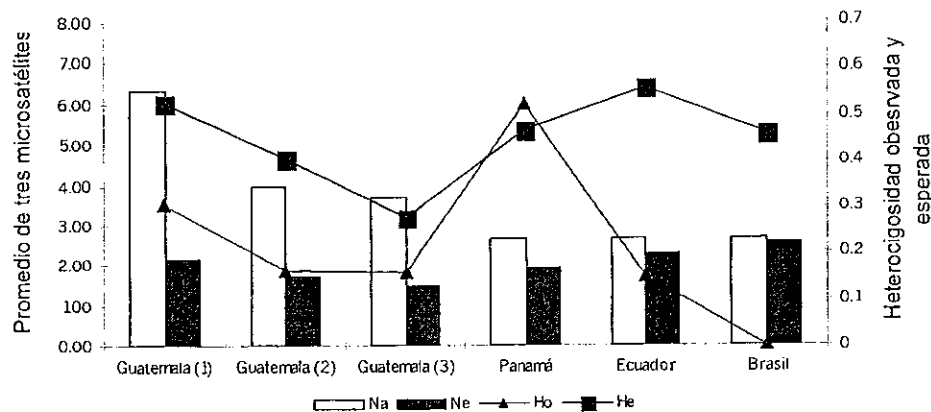
Datos promedios por país en los locus MS3, MS5 y MS6

	Na	Error estándar	Ne	Error estándar	Ho	He	Error estándar
País							
Guatemala (1)	6.33	3.33	2.18	0.28	0.31	0.53	0.05
Guatemala (2)	4.00	1.00	1.72	0.15	0.16	0.41	0.05
Guatemala (3)	3.67	1.20	1.48	0.26	0.16	0.28	0.13
Panamá	2.67	0.67	1.93	0.23	0.52	0.47	0.06
Ecuador	2.67	0.33	2.28	0.14	0.15	0.56	0.03
Brasil	2.67	0.88	2.56	0.87	0	0.46	0.23

Guatemala (1): Análisis de muestras con MS3 completo. Guatemala (2): Análisis de muestras MS3 parcial. Guatemala (3): Análisis de muestras con MS6 convirtiendo el alelo 241 a 240 pares de bases y tomando MS3 parcial. Na: número de alelos absolutos promedio; Ne número efectivo de alelos promedio; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada promedio

Gráfica 6

Patrón alélico promedio por país



Na: número de alelos absolutos promedio; Ne número efectivo de alelos promedio; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada promedio

Aunque el valor promedio de heterocigosidad observada obtenido en las muestras de Guatemala es similar al obtenido en el estudio de Oliveira *et al.*, (1998) con sus ocho microsatélites con las muestras de Brasil (0.31 contra 0.49), el rango observado en Guatemala es mucho más estrecho que el obtenido con los microsatélites (CA) en Brasil: en el primer caso los valores oscilan entre 0.034 y 0.56, mientras que los de Oliveira, *et al.* se encuentran entre 0.20 y 0.80. Además, al tomar el locus MS3 parcial, la diferencia entre el valor obtenido por Oliveira *et al.* y el nuestro aumenta, 0.16 contra 0.49. Al comparar estos datos se podría decir que el grado de polimorfismo con los microsatélites en Guatemala es bajo. Cabe destacar que la conversión del alelo 241 a 240 pares de bases en el locus MS6, modifica poco los valores del número de alelos totales y de número de alelos efectivos.

No obstante, el valor promedio obtenido con los microsatélites diseñados es mayor que el determinado al analizar 22 locus con isoenzimas (0.245 contra 0.035), (*vid* cuadro 20) (Lewicka *et al.*, 1995).

Cuadro 20

Comparación de heterocigosidad y número de alelos obtenidos mediante isoenzimas y microsatélites

Dato analizado Método	Número de individuos	Número de locus	Número de alelos/locus	Heterocigosidad observada promedio (Ho)	Heterocigosidad esperada promedio (He)
Microsatélites <sup>†</sup>	43	3	12	0.245	0.503
Isoenzimas <sup>*</sup>	31	22	4	0.035	0.394

<sup>†</sup> De acuerdo a datos obtenidos en proyecto, <sup>‡</sup> De acuerdo a estudio de Oliveira *et al.*, 1998. <sup>\*</sup> De acuerdo a Lewicka *et al.* 1995.

2. Equilibrio de Hardy-Weinberg. En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, se advierte que la heterocigosidad observada es menor a la esperada, salvo en el caso de Panamá para los locus MS3 y MS6. El exceso de homocigosidad implica una violación de alguna de las suposiciones de Hardy Weinberg. Podría corresponder a la presencia de alelos nulos por una no-detección o, debido a la rigidez de las reglas impuestas, a un no registro de ellos; aunque Oliveira *et al.* indican que lo observado es típico en una población con estructura clonal.

Sin embargo, de acuerdo a Tibayrenc (1995) al trabajar con *T. cruzi* el equilibrio de Hardy-Weinberg no es aplicable. Estudios previos con isoenzimas han mostrado una heterocigosidad constante en algunas cepas del parásito, lo cual es incompatible con los test de segregación, como lo es el equilibrio de Hardy-Weinberg (con un apareamiento al azar, incluso de los padres son heterocigotos, hay un 50% de homocigosidad obligatoria entre la siguiente generación). Una heterocigosidad fija puede ser útil para determinar si la población es sexual o clonal, aunque siempre bajo la suposición de una diploidía, lo cual ha sido no ha sido demostrado en el caso de *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc, 1995; Gaunt *et al.*, 2003).

3. Índice de similitud y distancia genética de Nei-Li. A partir de la presencia de los alelos amplificados en los tres locus se construyó una matriz de cero y uno, donde cero corresponde a alelo ausente y uno a alelo presente. Para cuantificar las relaciones entre los diferentes genotipos, se hizo un análisis basado en la proporción de alelos compartidos (índice de similitud de Nei-Li: S) en el genotipo total, entre todos los posibles pares de muestras (matriz anexo H). Los resultados fueron transformados a un coeficiente de disimilaridad ( $D = 1-S$ ), el cual fue utilizado como una medida de distancia genética (matriz anexo I). La información derivada de esta fórmula fue sometida al método aglomerativo jerárquico, *agglomerative nesting*, AGNES, por sus siglas en inglés, para construir el dendrograma correspondiente a las muestras individuales. Cada uno de los procedimientos se hizo con la información obtenida analizando el locus MS3 completo y parcial. Debido al número de aislados caracterizados, los resultados obtenidos deben ser considerados como información preliminar. Cabe mencionar que la muestra de *T. cruzi* aislada de *Rhodnius prolixus* puede no ser representativa de este vector, ya que esta especie de triatomino no tiene como hábitat común el departamento de Jalapa, por lo que es posible que el parásito que lo infectó esté adaptado al vector *T. dimidiata*.

En el caso de tomar el MS3 completo, se produjo el dendrograma que muestra la figura 18A. Los aislados de *T. cruzi* formaron dos grandes grupos: I y II. El grupo II contiene todos los aislados correspondientes a Ecuador y dos muestras de Brasil. Estos siete aislados corresponden al linaje dos, de acuerdo a los marcadores TC1 y TC2, el cual circula en un ambiente silvestre, pero tiene la capacidad de colonizar asentamientos humanos (Martinez *et al.*, 2001). Esto es esperado ya que todas las muestras de Ecuador fueron aisladas de mamíferos reservorios y las de Brasil de humanos (*vid* cuadro 7 para descripción de aislados). El grupo I contiene cuatro sub-divisiones. Esta segmentación no se basa ni en la localización geográfica ni de acuerdo a los marcadores TC1 y TC2, ya que se encuentran encasilladas muestras obtenidas en Jutiapa y Baja Verapaz con linajes indeterminado y mezcla de uno y dos (*vid* dendrograma sub-grupo I). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que no se encuentra ningún parásito aislado de mamíferos reservorios, lo cual implica que las muestras presentes en el grupo I circulan más bien en el ciclo doméstico. Cabe mencionar, que el valor de AC es cercano a 1, 0.84, indicando una buena estructuración de la información ingresada al algoritmo.

El dendrograma obtenido tomando el MS3 parcial, se obtuvo un mejor AC (0.93 contra 0.84), por lo que se cree que la presencia de fragmentos no esperados se debe a la amplificación de un segundo locus. En este caso, la estructura del dendrograma presenta valores de distancia entre grupos mayores que en el caso anterior, por ejemplo la distancia entre los dos grupos más separados es de 0.5 y 2.5 para el primer y segundo caso respectivamente. Esto podría suponer que al eliminar el segundo locus amplificado, las diferencias entre muestras son más marcadas. Sin embargo, cabe mencionar que entre las deficiencias del algoritmo es que la estructura se impone a los datos y no viceversa.

Como se observa en las figuras 18B, el dendrograma separa las muestras en dos grandes grupos, I y II. El primer grupo está, a su vez, subdividido en cuatro grupos. Sin embargo, la creación de éstos no coincide con lo advertido en el dendrograma MS3 completo. En esta caso el grupo II, constituido únicamente de dos muestras, engloba un aislado de triatomino y otro de humano. Ambos pertenecen al linaje tipo dos, es decir se espera que ambos circulen en el ciclo silvestre. Al analizar las subdivisiones del grupo I, se podría decir que las muestras originarias de Guatemala y Panamá se agrupan, principalmente, en los grupos uno, dos y cuatro, mientras que las de Sur América en el tres. Además, se advierte que en los grupos uno y dos se concentran todos los parásitos aislados de triatominos, salvo para dos muestras obtenidas de humano y reservorio mamífero. En el caso del grupo tres, se aglomeran todas las muestras de Brasil y Ecuador, cuyo origen es una mezcla de humano, mamífero silvestre y domiciliario. Esto podría sugerir que está existiendo cierto flujo entre los ciclos silvestres y domiciliarios. En el grupo cuatro se observa una agrupación de aislados de triatominos, humano y reservorio mamífero silvestre. Cabe mencionar que en todos los grupos se observa una mezcla de linajes por lo que no se puede asignar al grupo de *T. cruzi* al que pertenece.

Al tomar el MS3 parcial y al corregir el tamaño del alelo en el locus MS6, el dendrograma obtenido agrupa los aislados de la misma manera que cuando se utilizaron los datos del MS3 parcial (*vid.* figuras 18B y 18C). Con ello se puede suponer que el cambio en el locus MS6 no es tan importante como para provocar un cambio en el agrupamiento de las muestras. Sin embargo, como se observa en las matrices de distancia, los valores son menores en el último caso (*vid.* anexo I). Esto es esperado ya que, al corregir el alelo de tamaño 241 por 240 pares de bases, los aislados de Guatemala tienen el genotipo en el locus MS6 más parecido entre sí (*vid.* anexo J).

Para esclarecer la agrupación de las muestras, éstas se tipificaron las muestras basándose en el genotipo obtenido con los tres locus (*vid.* apéndice J), tomando el MS3 parcial por un lado, y por otro el MS3 parcial y corrigiendo el tamaño del alelo de 241pb. el locus MS6. De este análisis se obtuvieron los histogramas representados en la gráfica 7A y 8A.

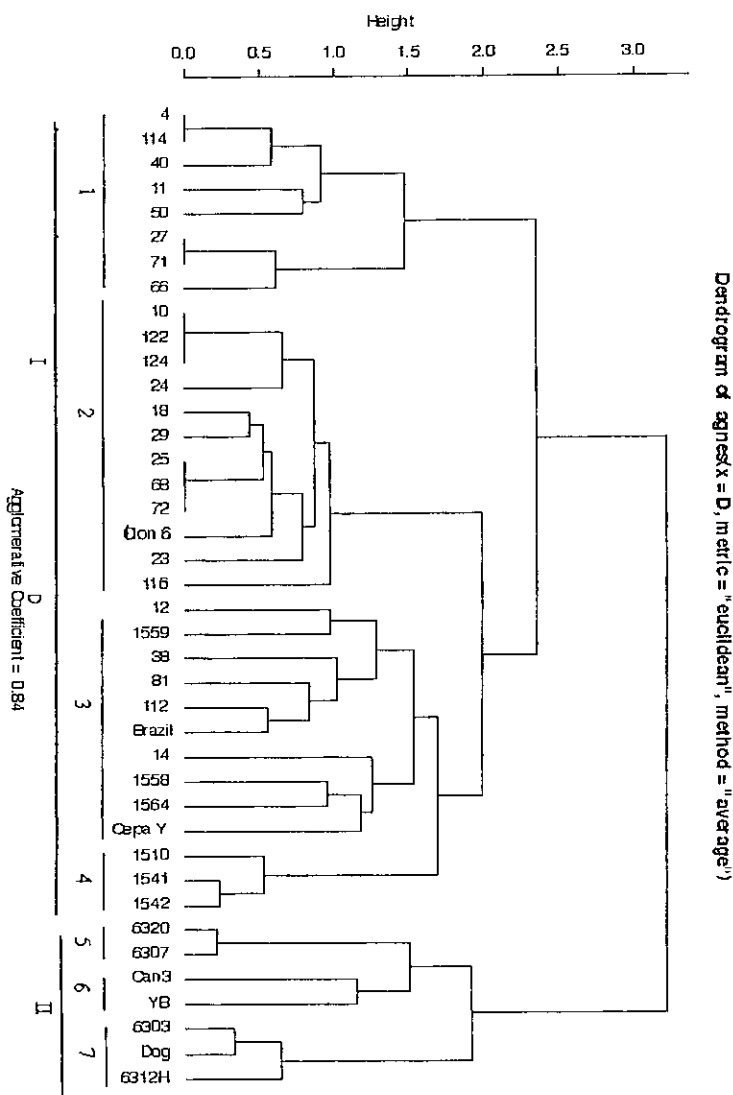
En el caso del MS3 parcial no existe ningún país que comparta el mismo genotipo, salvo un caso entre Guatemala y Brasil (*vid.* gráfica 7A). Además, en la mayoría de los casos los genotipos no se repiten en los aislados obtenidos de Panamá, Ecuador y Brasil, lo cual es un rasgo de alto polimorfismo a lo largo de los países y dentro de Guatemala. Las frecuencias máximas se encuentran en los genotipos cuatro y diez (homocigotos para los tres locus y heterocigoto para el locus MS5 y homocigoto para los dos restantes, respectivamente) ambos presentes únicamente en Guatemala. A simple vista no existe ningún tipo de correlación con la agrupación obtenida en el dendrograma. Sin embargo, al analizar el genotipo, muestra por muestra, se observa que existe una agrupación en función de éstos. En el extremo derecho del dendrograma se encuentran las dos muestras que poseen alelos nulos en dos de los microsatélites.

Por su lado, al analizar los genotipos dentro de Guatemala se observan dos agrupaciones que comparten el genotipo cuatro y el diez (*vid* gráfica 7B). En el primer caso se encuentra Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Chiquimula; y en el segundo, Baja Verapaz, Zacapa, Santa Rosa y Chiquimula. La presencia de Baja Verapaz en el segundo grupo podría indicar que los aislados agrupados podrían estar circulando en el ciclo silvestre. Para poder corroborar sería interesante poder tipificar las muestras de acuerdo a su linaje con los cebadores TC1 y TC2.

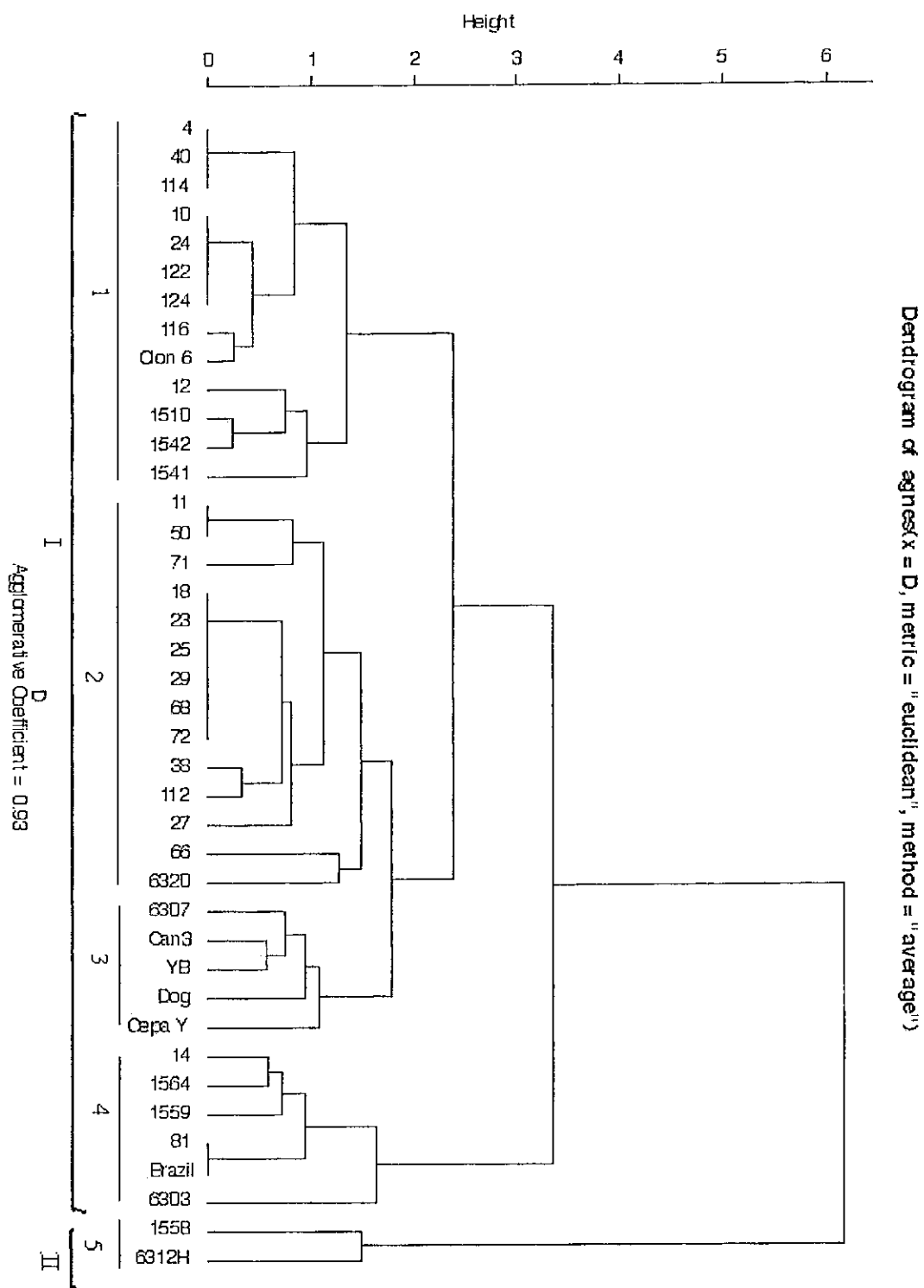
Figura 18

Dendrograma de 40 aislados de *Trypanosoma cruzi* basado en la distancia genética de Nei-Li

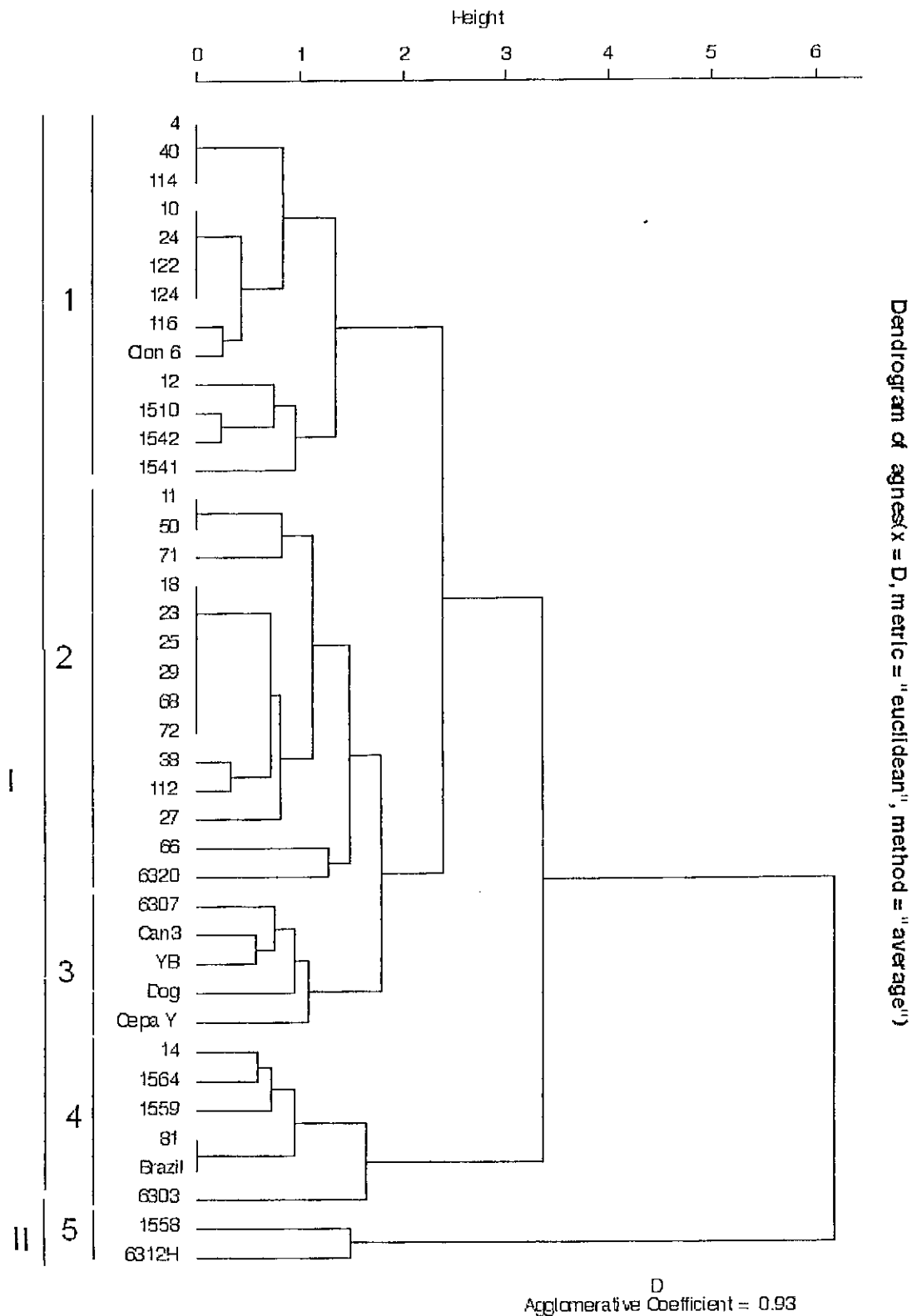
A. Tomando locus MS3 completo



B. Tomando locus MS3 parcial



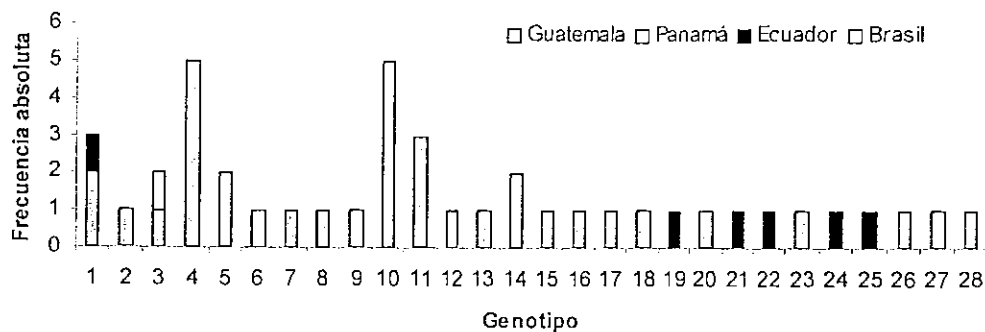
C. Tomando MS3 parcial y corrección de tamaño del alelo de 241pb. en MS6



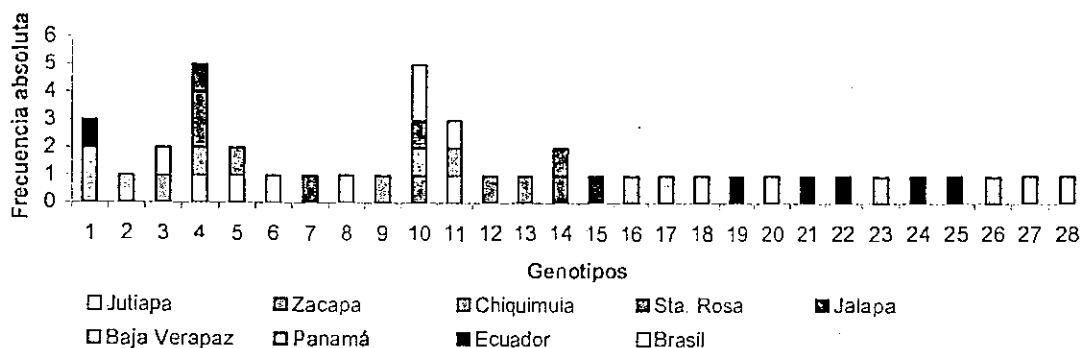
Gráfica 7

Frecuencia de genotipos en *T. cruzi* por departamento y por país MS3 parcial

Por país



Por departamento de Guatemala y por país



Al construir el histograma basado en el genotipo de los tres loci, tomando el MS3 parcial y corregir el tamaño del alelo de 241 pares de bases en el locus MS6, se observan más o menos las mismas observaciones que en el caso anterior: La representación de cada aislado por un genotipo único para los países de Panamá, Ecuador y Brasil; el traslape de un genotipo entre Guatemala y Brasil (*vid* gráfica 8A) y la presencia de dos genotipos predominantes en los aislados de Guatemala (*vid* gráfica 8B). La primera observación indica el alto grado de polimorfismo en los loci identificados en el estudio en los países mencionados, aunque el bajo número de muestras pueda estar presentando un sesgo. Por otro lado, el hecho que se observe un genotipo compartido entre Brasil y Guatemala pueda deberse posiblemente a que ambos aislados presentan un alelo nulo en el locus MS3. Finalmente, los dos genotipos predominantes separan los aislados de Guatemala ligeramente diferente en este análisis. Agrupa por un lado los



4. **Índice de Simpson.** Para poder establecer si por medio del genotipo de la muestra se puede predeterminar la localización geográfica de ésta, se calculó índice de Simpson (D). Este parámetro se estableció tanto en los datos del microsatélite MS3 parcial, como en aquellos donde los microsatélites MS3 y MS6 fueron corregidos. Como se observa en el cuadro 21 en ambos casos estudiados los valores del índice de Simpson son cercanos a cero. Este resultado indica que el nivel de diversidad es alto y que la posibilidad de correlacionar genotipo con localización geográfica es alta. Por otro lado, se puede observar que el cambio en el valor del índice no varía mucho entre las muestras analizadas; pero cabe mencionar que la conversión del alelo de 241 pares de bases a 240 pares de bases sí provoca un aumento, es decir una disminución de la diversidad, lo cual es lógico.

Cuadro 21

## Índice de Simpson (D)

Datos corregidos en MS3	Datos corregidos en MS3 y MS6
0.032	0.058

5. **Identidad y distancia genética de Nei.** Una vez determinados los subgrupos del total de muestras, se determinó la identidad y distancia genética de Nei para cuantificar basándose en las frecuencias alélicas y la divergencia entre grupos y sub grupos formados. Esto se llevó a cabo analizando con el locus MS3 completo y parcial.

Al tomar locus MS3 completo, la distancia genética de Nei (1978) entre los grupos I y II fue de 3.5790, correspondiendo a una identidad genética de 0.0279. Esto indica una marcada divergencia entre ambos grupos, lo cual apoya la estructuración del dendrograma anterior. Las distancias genéticas entre las subdivisiones del grupo I oscilaron entre 0.2034 y 2.563, lo cual sugiere que existe una subdivisión significativa dentro de los aislados.

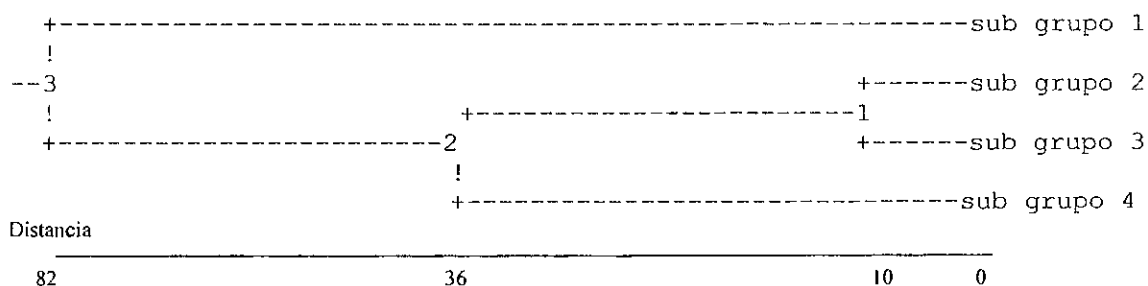
Cuadro 22

Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I  
(Locus MS3 completo)

Sub-grupos	1	2	3	4	Huésped
1	*	0.7771	1.5672	2.563	<i>T. dimidiata</i>
2	0.4597	*	0.2034	1.04115	<i>T. dimidiata</i> Humano
3	0.2086	0.816	*	0.7867	<i>T. dimidiata</i> <i>R. pallescens</i> Humano
4	0.0771	0.3529	0.4554	*	<i>R. pallescens</i>

Debajo de diagonal Identidad Genética de Nei (1978), Arriba de diagonal Distancia Genética de Nei (1978)

Figura 19  
Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 completo)



Al analizar los grupos y sub grupos obtenidos con locus MS3 parcial, se obtuvo que la distancia genética de Nei (1978) entre los grupos I y II fue de 0.81, correspondiendo a una identidad genética de 0.44. La distancia entre los grupos formados en este caso es mucho menor a la obtenida en el caso anterior, esto podría suponer que la estructuración del dendrograma obtenido en el primer caso es mejor, incluso teniendo un menor AC. Sin embargo, al ser más probable que se esté amplificando un segundo alelo en el locus MS3, se podría decir que la distancia de Nei es mejor para el análisis de microsatélites; al estar mezcladas las muestras, se disminuye la distancia genética entre ellas. Las distancias genéticas entre las subdivisiones del grupo I variaron desde 0.143 hasta 2.147, lo cual sugiere que existe una subdivisión significativa dentro de los aislados. Cabe mencionar que esta agrupación parece lógica, ya que une los sub grupos uno y dos con el cuatro, correspondiendo a todos los aislados de Sur América, y se está separando al grupo tres, correspondiente a una mezcla de todos los países.

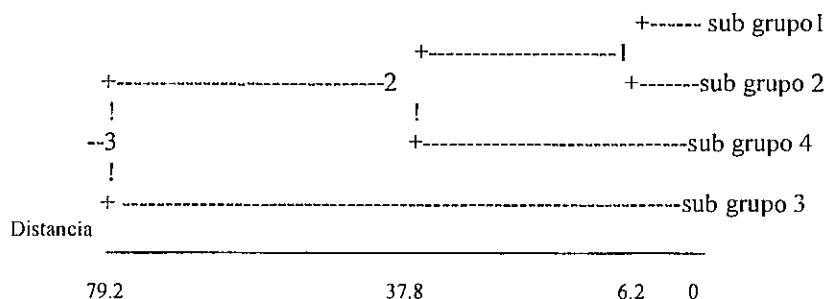
Cuadro 23  
Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I  
(Locus MS3 parcial)

Sub-grupos	1	2	3	4
1	*	0.123	2.059	0.755
2	0.867	*	1.748	0.756
3	0.128	0.174	*	0.945
4	0.470	0.469	0.3889	*

Debajo de diagonal Identidad Genética de Nei (1978), Arriba de diagonal Distancia Genética de Nei (1978)

Figura 20

Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 parcial)



Al analizar los grupos y sub grupos obtenidos con locus MS3 parcial y corrigiendo el alelo de 241 pares de bases en el locus MS6, se obtuvo que la distancia genética de Nei (1978) entre los grupos I y II fue de 1.11, correspondiendo a una identidad genética de 0.33. Al comparar estos valores con el anterior, MS3 parcial, se observa que la formación de estos dos grupos tiene una mayor distancia, con lo cual se podría decir que la estructuración del dendrograma es mejor. Sin embargo, la subdivisión del grupo I muestra una menor distancia entre los grupos formados (los valores varían de 0.90 a 1.62), aunque la agrupación de estos últimos es igual al análisis del MS3 parcial. Esta observación recalca la necesidad de utilizar otra metodología para construir el dendrograma.

Cuadro 24

Identidad y distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I

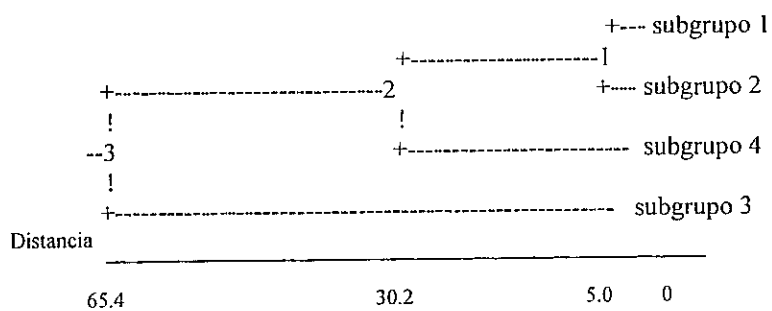
(Locus MS3 parcial y corrección de alelo de 240pb de MS6)

Sub-grupos	1	2	3	4
1	*	0.9092	1.6229	0.6247
2	0.9055	*	1.4124	0.5849
3	0.1973	0.2436	*	0.8878
4	0.5354	0.5572	0.4115	*

Debajo de diagonal Identidad Genética de Nei (1978), Arriba de diagonal Distancia Genética de Nei (1978)

Figura 21

Dendrograma basado en distancia genética de Nei (1978) para sub-grupos de grupo I. (Locus MS3 parcial y corrección de alelo de 240pb de MS6)



## VII. CONCLUSIONES

1. La clonación de fragmentos ricos en microsatélites con unidades repetitivas compuestas de tres nucleótidos es más eficiente en comparación a las formadas por di- o tri- nucleótidos.
2. La inestabilidad de los microsatélites en el vector disminuye el rendimiento de la clonación.
3. La presencia de uno o dos alelos en los interferogramas de las muestras correspondientes a Guatemala, Brasil y Panamá sugiere la posibilidad de una diploidía del *T. cruzi* en la mayoría del genoma.
4. La presencia de más de dos alelos en tres aislados provenientes de Ecuador podría deberse a una infección mixta o a una poliploidía en ciertas regiones del genoma.
5. La presencia de alelos no esperados en las muestras de Guatemala en el locus MS3, puede corresponder a la amplificación de un segundo locus o a que el MS3 sea un minisatélite.
6. Guatemala y Panamá presentan un mayor grado de polimorfismo con los microsatélites identificados en el estudio.
7. El grado de polimorfismo obtenido con los microsatélites diseñados en este estudio es menor que el obtenido con los microsatélites diseñados en Brasil.
8. El exceso de homocigotos observados puede ser el resultado de un alto número de alelos nulos.
9. La desviación del equilibrio de Hardy Weinberg apoya la teoría de estructura clonal en el *T. cruzi*.
10. La formación de dos grupos de genotipos en los aislados de Guatemala, opuesto a la individualidad genética del *T. cruzi* observada en el estudio con microsatélites polimórficos en Brasil, puede explicarse por el reducido número de locus analizados.
11. La tipificación con el genotipo de los tres microsatélites utilizados diferencia casi en un cien por cien la localización geográfica (países) de los aislados, pero son necesarios estudios posteriores para determinar si el desigual número de muestras no ejerce influencia en este comportamiento.

12. La diferencia en la heterocigosidad observada en los estudios de microsatélites diseñados en Guatemala y Brasil respectivamente, puede asociarse a la diversidad en el origen de los aislados y al número de microsatélites analizados en Brasil.
13. De acuerdo al índice de Simpson, a partir de los genotipos de los tres microsatélites se podría asignar a cada aislado su origen geográfico.
14. El dendrograma MS3 completo permite agrupar las muestras analizadas en dos principales grupos, los cuales no pueden correlacionarse con los obtenidos en estudios previos por falta de tipificación de los aislados con otros marcadores moleculares.
15. La alta dispersión entre los grupos formados en el dendrograma MS3 Parcial se deba posiblemente al tipo de método de agrupación utilizado, ya que es posible que la tasa de mutación en los microsatélites no sea constante en todos los locus.
16. La corrección de alelos no canónicos, como se corrigió en el microsatélite MS6, no afectó la estructura del dendrograma en comparación con el obtenido utilizando el MS3 Parcial; indicando que este tipo de alelo puede ser que no afecte significativamente la agrupación de los aislados.

## VIII. RECOMENDACIONES

Una de las limitaciones del estudio es el reducido número de microsatélites y la poca diversidad de los aislados de *T. cruzi* analizados en este estudio. Esto podría subestimar la variabilidad génica de las cepas presentes en los departamentos endémicos de Guatemala; por lo que se recomienda identificar más microsatélites para estudios posteriores. De ser posible, se exhortaría el análisis de aquellos microsatélites de naturaleza perfecta y con un número de repeticiones mayor a ocho, idealmente, entre once y diecisiete, ya que éstos han mostrado mayor polimorfismo. Trabajar con más de tres microsatélites produciría resultados más significativos.

Por otro lado, el número desigual de muestras entre los países analizados es posible que introduzca un sesgo en los resultados, dado que posiblemente se estén dejando de contemplar otros alelos presentes en las poblaciones de Panamá, Ecuador y Brasil. Por lo que el estudio presentado debería de ser tomado como un análisis preliminar.

En cuanto a la naturaleza y número de aislados por población analizada, sería necesario trabajar con clones para facilitar el registro de los alelos amplificados y con un tamaño de muestra grande, para que la presencia de alelos nulos pueda ser eliminada sin representar una gran pérdida de información. Sobre todo en el caso de Panamá.

Para evitar la sobreestimación de polimorfismo en los microsatélites, es necesario eliminar los alelos que correspondan al artefacto, de la reacción en cadena de la polimerasa, que provoca la adición de una adenina.

Para corroborar la concordancia de los grupos obtenidos en este estudio con los publicados con otros marcadores, sería aconsejable trabajar con aislados tipificados con otros marcadores moleculares, como el mini-exon por ejemplo.

Como la tasa de mutación de los microsatélites varía dependiendo del locus, los dendogramas basados en distancias genéticas se deberían de construir utilizando el método de *Neighbour Joining*, el cual no supone un reloj biológico, contrariamente al UPGMA.

Debido a la falta de conocimiento en cuanto a la ploidía del *Trypanosoma cruzi* y a las evidencias de una heterocigosidad fija, el equilibrio de Hardy-Weinberg debería de ser remplazado por el test de desequilibrio de unión (*Linkage disequilibrium*).

Para poder determinar el mecanismo de mutación encontrado en el estudio sería útil obtener la secuencia de varios aislados por microsatélite. Conociéndolas se podría enfocar con mayor precisión el modelo de análisis, ya sea el de alelos infinitos, *infinite allele model*, o el de mutación paso a paso, *step wise mutation model*.

Para poder determinar el mecanismo de separación obtenida por los microsatélites en el estudio sería necesario tener tipificados los linajes de cada aislado y así corroborar si la separación es conforme a lo reportado en otros trabajos.

Para eliminar el error inducido en el registro de alelos, al considerar al parásito diploide, sería interesante identificar microsatélites en el ADN mitocondrial. Al ser heredado únicamente de la madre, es haploide; por lo que facilitaría la detección de mezclas y la escogencia del alelo predominante.

De acuerdo a Miles, la distancia de Nei debería ser remplazada por la de Cavalli Sforza, por lo que se recomienda el uso de un programa que pueda determinarlo.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Agüero, F., Verdún, R. E., Frasch, A. C. C. 2000. "A Random Sequencing Approach for the Analysis of the *Trypanosoma cruzi* Genome: General Structure, Large Gene and Repetitive DNA Families, and Gene Discovery". *Genome research*. [Online] 10:1996-2005. (Last revised, november 2002), [http://www.genome.org/cgi/content/full/10/12/1996?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULT\\_FORMAT=&author1=Aguero%2C+F&searchid=1043123318853\\_1464&stored\\_search=&FIRSTINDEX=0&journalcode=genome](http://www.genome.org/cgi/content/full/10/12/1996?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULT_FORMAT=&author1=Aguero%2C+F&searchid=1043123318853_1464&stored_search=&FIRSTINDEX=0&journalcode=genome)
2. Anderson, J.M., Lai, J.E., Dotson, E.M., Rosales, C.C., Ponce, C., Norris, D.E., Beard, N. 2002. "Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Tritoma dimidiata*" *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier Science B.V. 30:1-6.
3. Atlas de Parasitología. *Trypanosoma (S) cruzi* (amastigotes). 2003a (Visto: enero 2003), <http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>
4. Atlas de Parasitología. *Trypanosoma (S) cruzi* (epimastigote). 2003b. (Visto: enero 2003), <http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>
5. Black, N., Du Teau, N. 1997. "RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies". In *Molecular Biology of Insect Disease Vectors and Methods Manual*. By (J. Crampton, C. Beard and L. By, eds). USA. Chapman and Hall. 45-48.
6. Blackstone, C.R., Dubey, J.P., Dotson, E., Su, C., Thulliez, P., Sibley, D., Lehmann, T. 2001. "High-resolution of *Toxoplasma gondii* using microsatellites loci". *Journal of Parasitology*, 87(6):1472-1475.
7. Blitzman, M. "Enfermedad de Chagas-Mazza". En 1er Congreso de Cardiología Virtual. Argentina. 2000. (Última revisión: enero 2003), [www.fac.org.ar/.../tcesp/tcc5600c/cblitzma/cblitzma.htm](http://www.fac.org.ar/.../tcesp/tcc5600c/cblitzma/cblitzma.htm)
8. Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz, S., 1996. "Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness". *Molecular Ecology*, 5:393-401.
9. Brown, T.A. 1998. *Gene Cloning: an introduction*. 3ed. Stanley Thorns Ltd. USA. 334pp.
10. Bull, L. N., Pabón-Peña, C.R., Freimer, N.B. 1999. "Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features". *Genome Research*, 9:830-838. [Online] [www.genome.org](http://www.genome.org)
11. Campbell, D. 2002. "*Trypanosoma cruzi*- Life cycle, morphology, pathogenesis". Lecture of molecular parasitology. USA. (Last revised: january 2003), <http://www.hhmi.ucla.edu/C168/week3/lecture1/lecture1.html>
12. Castillo, Alejandra. 2002. "Análisis de variabilidad génica de *Trypanosoma cruzi* aislado de triatomíneos de 5 áreas endémicas de Guatemala" Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 164pp.

13. Cordon Rosales, Celia. "Investigación operativa sobre los triatomínicos vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala". En: *Iniciativa de Centro América y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por R. Prolixus, disminución de la infestación intradomiciliaria por T. dimidiata y la eliminación de la transmisión transfusional del T. cruzi*, (San Salvador 11-13 de marzo de 2002), CES, UIE, Universidad del Valle de Guatemala, OPS, 2002.
14. CDC. 2000a Chagas disease in the Americas: combating a neglected fatal disease. USA, Center for Disease Control, USA p. 4
15. CDC. 2002b American Trypanosomiasis. (Last revised: January 2003), Last updated 2002. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>
16. Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. 2000. "Microsatellites: consensus and controversy" *Comparative Biochemistry and Physiology Elsevier Science*, Part B 126: 455-476
17. Dorak, M.T. 2003. Basic population genetics. Last reviewed, junio 2003. (Last revised, July 2003). <http://home.att.net/~dorak/genetics/popgen.html>
18. Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., 1996. "Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites". In: *Molecular systematics*, Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. 2nd Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. USA. P 655.
19. Dudoit, S., Gentleman, R. Cluster analysis in DNA microarray experiments. (Last revised: September 2003), Last updated: 2002. <http://www.bioconductor.org/workshops/Vienna03/lectures/cluster.pdf>
20. Dumonteil, E. 2000, Dinámica y genética de las poblaciones de vectores: hacia un mejor control Centro de investigaciones regionales, unidad biomédica, México (Visto: enero 2003), Last updated: 2000, <http://www.uady.mx/~biomedic/eod.html>
21. Fonseca, M.; Romanah, A.J. 2002 "Characterization of *Trypanosoma cruzi*". Institut Pasteur. France. Supl. I: 177-180 (Last revised, November 2002), <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chagas/14.html>
22. Gaunt, M; Yeo, M; Frame, I.A; Stothard, J.R.; Carrasco, H.J.; Taylor, M.C.; Solis, S.M.; Veazey, P.; Miles, G.A.J.; Acosta, N.; Rojas, A.; Miles, M.A. 2003. "Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes". *Nature*, 421: 936-939.
23. Goldstein, D.B., Schlöterer, 1999. **Microsatellites: evolution and application**. Oxford University Press. New York, USA. P.341
24. Grijalva, M.J. 2002, "Propuesta para describir la transmisión del *Trypanosoma cruzi* en el ciclo silvático en la provincia de Manabi, Ecuador". Biomedical Science Department, Ohio University, Athens, USA. p.46
25. Hartl, D.L., Clark, A.G.. 1998, **Principles of population genetics**. 3<sup>rd</sup> Edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA, 481pp.
26. Hartwell, L., Hood, L. Goldberg, M. Reynolds, A., Silver, L., Veres, R. 2000. **Genetics: from genes to genome**. USA. McGrawHill. 820pp.

27. INGEBI. 2003 "Características de *Trypanosoma cruzi*". In Molecular biology of Chagas disease laboratory". Argentina. (Last revised: december 2002), <http://Therion.dna.uba.ar/labchagas/investiga.htm>
28. Jarne, P., Lagoda, P.J.L. 1996. "Microsatellites, from molecules to populations and back". *Trends in Evolution and Ecology*, 11(10): 424-429.
29. Ku Aktuell. República de Panamá y el Canal de P. (Last updated: 2003). <http://www.kulmbach.net/~MGF-Gymnasium/bilderdaten/latinoam-panama/>
30. Larsen, D. R. Natural resource biometrics: Measure of diversity. University of Missouri-Columbia. (Last updated: October 2002), <http://www.snr.missouri.edu/natr211/topics/simpsons.html>
31. Lewicka, K., Berniere-Campana, S.F., Barnabe, C., Dedet, J.P., Tibayrenc, M. 1995. "An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana". *Experimental Parasitology*, 81:20-28.
32. Macedo, A.M., Pimenta, J.R., Aguiar, R.S., Melo, A.I.R., Chiari, E., Zingales, B., Pena, S.D.J. Oliveira, R.P. 2001. "Usefulness of microsatellites typing population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96(3):407-413.
33. Macedo, A. M., Oliveira, R. P. and Pena, S.D.J. 2002 "Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis". *Exp. Rev. Mol. Med.* Expert Cambridge University Press ISSN 1462-3994. (Last revised: january 2003), <http://www-ermm.cbccu.cam.ac.uk/02004118h.htm>
34. Mack, S., Meyer, D. October 2001. Workshop on biostatistics and population genetic analysis. ASHI meeting, San Francisco, USA. (Last revised, july 2003) <http://allele5.biol.berkeley.edu/~diogo/ashi01/index.html>
35. Manchester Metropolitan University. Cluster analysis: What is it?. (Last revised: September 2003). Last updated August 2003. <http://obelia.jde.aca.mmu.ac.uk/multivar/ca.htm#what?>
36. Martínez-Díaz, R.A. Escario, J.A., Nogal-Ruiz, J.J. Gómez-Barrío, A.G. 2001. "Relationship between biological behaviour and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* strains" *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96(2):251-256.
37. Martins S. M. 1976. American Trypanosomiasis Research. Washington, D.C., USA., *Pan American Health Organization*, p. 410.
38. McDonald, D. 2000. *Molecular marker glossary*. USA. 31pp.
39. Monteiro, F.; Escalante, A. and Beard, B. 2001. "Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective" *Trends in Parasitology*. 17(7):344-347.
40. NIU Bioinformatics and Genomics Center. Two dimensional ordination of genetic similarity matrix. (Last revised: july 2003). Last updated 2003. <http://biolinx.bios.niu.edu/t80maj1/nlds.html>
41. Offwell woodland and wildlife trust. *Simpson's diversity index*. 2002. <http://www.offwell.free-online.co.uk/simpsons.htm>

42. Ohio State University. *Rhodnius prolixus*, images. Department of Biological Science. Ohio, U.S.A. (Last revised: January 2003), Last updated: 2002, <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/rhodnius.html>
43. Ojeda, L. M.C., Murguía, M.P. 1998 "Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana" *Gac. Med. Mex.* 134(2):757-759.
44. Oliveira, R.P., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, S.D.J. 1997. "An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites". *Parasitology Today*, 13(5): 196-200.
45. Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L. Pena, S.D.J., 1998. "Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites" *Proc. Natl. Acad. Sci. Genetics USA*, 95:3776-3780
46. Oliveira, R.P. Melo, R.A.I., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, S.D.J. 1999. "The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA- repeat microsatellites". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro, 94, Supl. I: 65-70.
47. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1999. Segunda reunión de la comisión intergubernamental de la iniciativa de Centroamérica y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, disminución de la infestación domiciliar por *Tritoma dimidiata*, y eliminación de la transmisión transfusional del *Trypanosoma cruzi*. Nicaragua, Organización Panamericana de la Salud. 29p.
48. Oswaldo Cruz Institute. 2002a. Estimated incidence of Chagas disease in American continent. Department of Biochemistry and molecular biology. Brazil, (Last revised: November 2002), <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/geograph.html>
49. Oswaldo Cruz Institute. 200b Geographical distribution of major triatomine vectors. Department of Biochemistry and molecular biology. Brazil, (Last revised: November 2002), <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/geograph.html>
50. Peakall, R., and Smouse, P.E. 2002. GenAlEx V5.02: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
51. Roderick, G.K. 1996. "Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses" *Annu. Rev. Entomol.* 41:325-352.
52. Seattle Biomedical Institute. Chagas' disease (American Trypanosomiasis). (Last revised: January 2003), Last updated: 2002, [www.sbri.org/mission/disease/chagas.asp](http://www.sbri.org/mission/disease/chagas.asp)
53. Spiess, E.B. 1977. **Genes in populations**. John Wiley & Sons. USA. Pp780.
54. Structural genomics of pathogenic protozoa. American Trypanosomiasis Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*). (Last revised: January 2003), Last updated: 2003, <http://depts.washington.edu/sgpp/chagas.html>
55. Sturm, N., Degraeve, W., C., Morel and Simpson, L. 1989. "Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnostics of Chagas". *Molecular and biochemical parasitology*. 33:205-214.

56. Tabashnik, W.J., Black, W.C., 1996. "Population Genetics in Vector Biology" In: *Biology of disease vectors*, Beaty, B.J., Marquardt, W.C. University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
57. Tacano, L., Edman, J.D. 2001. "Movement of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) within a simulated house environment". *J. Med. Entomol.*, USA, Vol 38(6):829-835.
58. Tibayrenc, M. 1995. "Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms". *Advances in parasitology*. Vol. 36. 47-55pp.
59. UNESCO. 7.1.4 Agglomerative Nesting. (AGNES). (Last revised: September 2003). Last updated: September 2001. [http://www.unesco.org/webworld/idams/advguide/Chapt7\\_1\\_4.htm](http://www.unesco.org/webworld/idams/advguide/Chapt7_1_4.htm)
60. Vallejo, G.A., Guhl, F., Chiari, E. and Macedo, A.M. 1999. "Specie-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA". *Acta Tropica* 72(2):203-212.
61. Vallejo, G. A.; Jaramillo, J. C., Carranza, J.C.; Sánchez, J.L.; Lozano, L. H.; Gualtero, D., Guayara, F., Cuervo, L. A.; Mojica, M. T.; Jaramillo, C. A. y Guh, F. 2000. "La biología molecular y sus aplicaciones en el estudio de la tripanosomiasis americana". *Medicina*. Vol. 22. No. 2. [En línea] <http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/ag-06gvallejo.htm>
62. Villee, C. 1996. *Biología*. 8 ed. México, D.F. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. 944pp.
63. Wanderly, S. 1999 "A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. [On line]. 94 supl.1: 17-36. (Last revised December 2002), <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/8300.html>
64. World Health Organization. 2000. "Weekly Epidemiological record, Geneva, Switzerland". 2:10-12. [On line] <http://www.who.int/ctd/chagas/whodocs.htm>
65. Yeh, C.F., Yang, R.C., Boyle, T. 1999. POPGENE VERSION V.1.31 Microsoft window- based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Canada. <ftp://ftp.microsoft.com/Softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>
66. Zeledón, R., Montenegro, V.M., Zeledón, O. 2001. "Evidence of colonization of man-made ecotopes by *Tritoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brazil, 96(5): 659-660.

## X. APÉNDICES

### A. Glosario

**Acido desoxirribonucleico (ADN):** Biopolímero cuyas unidades son desoxirribonucleótidos y que constituye el material genético de las células y contiene en su secuencia la información para la síntesis de proteínas (Real Academia Española).

**Acido ribonucleico (ARN):** Biopolímero cuyas unidades son ribonucleótidos. Según su función se dividen en mensajeros, ribosómicos y transferentes (Real Academia Española).

**ADN cinetoplasto (kDNA):** Es el ADN mitocondrial. Red de moléculas concatenadas con una estructura discoide, y está compuesta por dos poblaciones discernibles de ADN circular: maxicírculos y minicírculos (Sturm *et al.*, 1989).

**ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD):** Procedimiento designado para detectar cambios de una base en loci polimórficos a través del genoma (Hartwell *et al.*, 2000).

**Adenina (A):** Una purina (base nitrogenada) que es componente de los ácidos nucleicos, un miembro del par de base A-T (adenina-timina) (Hartwell, *et al.*, 2000).

**Aislado:** Es un conjunto de cepas de *Trypanosoma cruzi* obtenido de un individuo, en este caso de un triatomino (comunicación personal: Pamela Pennington).

**Alelo:** Una variante de un segmento de material genético. Los organismos diploides tendrán dos alelos potenciales para cualquier segmento de ADN en particular (un gen). Si los alelos son iguales en ambos cromosomas, el individuo es homocigoto; si los alelos son distintos es un heterocigoto. Originalmente este término se utilizaba para rasgos heredados en forma Mendeliana. Ahora se utilizan como formas alternativas en un locus genético. Los alelos codominantes son particularmente útiles como marcadores genéticos (McDonald, 2000).

**Alelo nulo:** alelo que no se visualiza bajo las condiciones analíticas (puede ocurrir en microsatélites) (McDonald, 2000).

**Aminoácido:** Moléculas que sirven para construir proteínas (Hartwell *et al.*, 2000). Compuesto orgánico que posee un grupo amino (NH<sub>2</sub>-) y un grupo carboxilo (-COOH); los aminoácidos pueden unirse para formar cadenas de péptidos en la molécula de proteína (Villem, 1996).

**Astringencia:** Condiciones de hibridación (tales como temperatura y concentración de los reactivos químicos) que determina el grado de similitud que resultará en la formación de moléculas de doble hebra (McDonald, 2000).

**Autoclave:** Equipo de alta temperatura para esterilizar y limpiar material de laboratorio; tales como medios, probetas, etc... (McDonald, 2000).

**Cebador:** Cadena corta, preexistente de polinucleótidos a partir de la cual se puede sintetizar ADN nuevo por medio de la acción de la ADN polimerasa. El cebador se une a un ácido nucleico como templado (ADN del organismo de interés) y promueve el copiado del ADN templado, iniciando desde el sitio de unión del cebador. Para amplificar los microsátélites se utiliza un cebador de ida y otro de vuelta. Algunos sitios de unión de los cebadores pueden conservarse entre familias, mientras que otros pueden variar entre congéneros (Hartwell *et al.*, 2000; (McDonald, 2000).

**Cepa:** Según el modelo hisotrópico clonal propuesto por Macerdo *et al.* (1998) las cepas de *Trypanosoma cruzi* representan un conjunto de clones (también llamada población multiclonal) que pueden formar relaciones simbióticas pero deben competir ferozmente por los recursos disponibles (Castillo, 2002).

**Citosina (C):** Una pirimidina (base nitrogenada) que es componente de los ácidos nucleicos, un miembro del par de base G-C (guanina-citosina) (Hartwell *et al.*, 2000).

**Clon:** Células cultivadas asexualmente diseñadas para producir múltiples copias de un gen o de un segmento de ADN. Para marcadores genéticos, el proceso generalmente involucra vectores de clonación y un cultivo de bacterias o levaduras (McDonald, 2000).

**Codominancia:** Expresión de fenotipo heterocigoto teniendo como resultado un descendiente que se asemeja a ambos padres. Los microsátélites son marcadores moleculares codominantes porque se puede distinguir un heterocigoto (dos bandas) de cada homocigoto (una banda) (Hartwell *et al.*, 2000; McDonald, 2000).

**Competente:** Preparado para la introducción del ADN del vector. Se hacen células "electrocompetentes" (generalmente *E. coli*) incrementando la permeabilidad con cloruro de calcio u otros reactivos (McDonald, 2000).

**Control negativo:** En el contexto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), éste significa hacer una reacción en la cual el agua reemplace el ADN de tal manera que cuando el producto sea visualizado se espera que no exista una banda. Si el control muestra una señal, se sospecha que hubo una contaminación en la mezcla del PCR o de uno de los reactivos utilizados en la amplificación (McDonald, 2000).

**Dendrograma:** Diagrama ramificado representando una jerarquía de categorías basada en el grado de similaridad o del número de características compartidas, especialmente en la taxonomía biológica (Merriam-Webster, 2004).

**Diploide:** Que tiene un doble complemento de los cromosomas (generalmente un set del padre y uno de la madre). Varios análisis genéticos se basan en aquellos organismos cuyas células son generalmente diploides (McDonald, 2000).

**dNTP:** Un deoxiribonucleótido (A, G, C o T). dNTP's libres en exceso son un componente esencial en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (McDonald, 2000).

**Distancia genética:** Varias estadísticas para medir la "distancia genética" entre subgrupos o poblaciones. Las principales distancias genéticas incluyen la distancia de Nei (1972, 1978), la distancia de Reynold's y nuevas medidas de distancia que incorporan el proceso de mutación paso a paso ("step wise") en los microsatélites (McDonald, 2000).

**Diversidad genética:** Una medida de variación genética en una población. Se calcula a partir de la raíz cuadrada de la frecuencia de un gen (alelo) (McDonald, 2000).

**EDTA:** Etilen diamina tetra acetato. Un preservante de comida, anticoagulante y un componente común en buffer de laboratorios (McDonald, 2000).

**Efecto de Wahlund:** Reducción en la homocigocidad (aumento en la heterocigocidad) cuando distintas taxa son analizadas en conjunto, o cuando se hibridizan. Siempre que las subpoblaciones varíen en la frecuencia genética, la población en total mostrará un efecto de Wahlund. El efecto opuesto ocurre cuando poblaciones divergentes se mezclan (McDonald, 2000).

**Electroferograma:** un registro que consiste en los componentes separados de una mezcla (tales como fragmentos de ADN) producidos por electroforesis en un soporte (acrilamida por ejemplo).

**Electroforesis:** Técnica que aplica el fenómeno de migración de sustancias por la acción de un campo eléctrico para la separación de moléculas (como fragmentos de ADN o proteínas) de una mezcla similar de moléculas. Se utiliza materiales como el acetato polarizado y las geles de agarosa o acrilamida a través de los cuales se corren proteínas o ADN. El material es separado dependiendo del peso y de la polaridad y permite distinguir variantes (por ejemplo alelos, variantes de enzimas) (Real Academia Española; McDonald, 2000).

**Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés PAGE):** Una técnica para la separación de fragmentos de AND basada en una movilidad diferencial dentro del gel (McDonald, 2000).

**Electroporador:** Equipo que se utiliza para transformar, por medio de la electroporación, células electrocompetentes (Castillo, 2002).

**Electroporar:** Proveer una descarga eléctrica en células para inducir la formación transitoria de poros en la membrana celular por donde las moléculas de ADN puedan entrar a la célula (Brown, 1998).

**Enzima de restricción:** Enzimas que cortan ADN encontradas en bacterias ( y aisladas de éstas para su uso). Como cortan dentro de la molécula, generalmente se les llama endonucleasas de restricción. Una enzima de restricción reconoce y corta el ADN únicamente una secuencia de nucleótidos particular. Los fragmentos obtenidos luego de la restricción pueden tener extremos rombos (“*blunt ends*”), si la enzima corta a través de la doble hélice, o extremos cohesivos (“*sticky ends*”), si la enzima corta de tal manera que obtiene extremos de hebra simple y que son capaces de unirse a otra hebra por complementariedad de bases (McDonald, 2000).

**Eppendorf:** Pequeño (0.2-1.8mL) tubo de polipropileno con tapadera para almacenar reactivos, muestras, etc... Pueden estar sujetos a fugas (McDonald, 2000).

**Erlenmeyer:** Frasco de vidrio resistente a altas temperaturas (de hasta 130lb de presión) en forma de cono (Castillo, 2002).

**Esquizodemo:** Nombre propuesto para las poblaciones de parásitos que generan patrones de restricción del DNA del cinetoplasto similar o idéntico (Macedo *et al.*, 2002).

**Frecuencia genética:** El término utilizado en las poblaciones para las frecuencias alélicas (McDonald, 2000).

**Gel:** Matriz de polímero que forma poros por los que pueden pasar diferentes clases de moléculas, como ADN o proteínas. El tamaño del poro depende del polímero que se esté utilizando y de la concentración del mismo, Entre mayor concentración de polímero más pequeño es el poro. Los polímeros más comúnmente utilizados son la agarosa y la poliacrilamida, pero se podría utilizar también acetato de celulosa y almidón (Castillo, 2002).

**Gene:** Unidad biológica de información genética; segmentos específicos de ADN compuestos por distintos grupos de pares de nucleótidos en una región discreta de un cromosoma que codifica para una proteína en particular, un locus codificante (Hartwell *et al.*, 2000).

**Genotipo:** El set de variantes de ADN encontrado en uno o más loci en un individuo. La información de la cual se puede desarrollar los genotipos pueden incluir alelos, secuencias o variantes de RFLP's (McDonald, 2000).

**Guanina (G):** Una purina (base nitrogenada) que es componente de los ácidos nucleicos, un miembro del par de base G-C (guanina-citosina) (Hartwell, *et al.*, 2000).

**Haploide:** que tiene un solo complemento de cromosomas (McDonald, 2000).

**Heterocigosidad:** Un individuo o un parámetro a nivel de una población. La proporción de loci heterocigotos esperados en un individuo (se encuentra entre 0 y 1.0) (McDonald, 2000).

**Hibridación:** En biología molecular, el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN para formar una molécula de doble hebra. Una hebra está generalmente marcada y es utilizada como sonda para detectar la presencia de una segunda hebra (McDonald, 2000).

**Hipervariabilidad:** Alto grado de variación entre individuos dentro de poblaciones locales con un marcador molecular en especial. Ejemplos de marcadores hipervariables incluyen los minisatélites y microsatélites (McDonald, 2000).

**Homoplasia:** Similitud de rasgos o genes por razones otras que la coancestralidad. La homoplasia viola el supuesto básico en el análisis de los marcadores genéticos (los variantes de fenotipo similar (por ejemplo tamaño de alelo) se asumen como provenientes de un ancestro en común (McDonald, 2000).

**Idénticos por descendencia:** Alelos derivados de un ancestro común y que tienen el mismo estado. Los alelos también pueden ser idénticos sin ser idénticos por descendencia (McDonald, 2000).

**Indel:** Evento de inserción o deleción en una secuencia molecular (McDonald, 2000).

**Intron:** Secuencias de ADN dentro de secuencia codificadora de un gen. Los intrones son transcritos a mRNA (ARN mensajero) pero son eliminados del mensaje antes que sea traducido a una proteína. Los intrones pueden contener secuencias involucradas en la regulación de la expresión génica (McDonald, 2000).

**Librería genómica:** Set de clones hechos a partir de fragmentos de ADN que se traslapan, generados al azar, los cuales representan el genoma completo de un organismo. El ADN es cortado en fragmentos por medio de enzimas de restricción y luego son clonados. El número de clones necesarios está en función del tamaño del genoma y del tamaño del fragmento de ADN (McDonald, 2000).

**Ligación:** Procedimiento mediado por enzimas que unen fragmentos de ADN. Las variantes incluyen ligación de extremos rombos o ligación de extremos cohesivos (McDonald, 2000).

**Ligación (*Linkage*):** Una asociación hereditaria entre los rasgos, de tal manera que la combinación del rasgo parental parece entre la progenia en mayor proporción que la observada en una no-parental. La proximidad de dos o más marcadores genéticos en un cromosoma; mientras más cercanos sean los marcadores menor probabilidad que éstos se separen durante la reparación o los procesos de replicación del ADN, y en consecuencia existe una mayor probabilidad que los rasgos sean heredados juntos (McDonald, 2000).

**Locus (loci en plural):** Del latín "lugar". Un segmento de ADN en un lugar particular del cromosoma. –generalmente utilizado para "gen" en un sentido más amplio, indicando un segmento de ADN analizado para el estudio de variabilidad (por ejemplo, un locus de microsatélite) (McDonald, 2000).

**Marcadores o estándares de masa molecular:** Mezcla de pequeños fragmentos de ADN de doble hebra de un tamaño y peso conocido que sirven como referencia para determinar la masa molecular de una mezcla de moléculas de ADN o mezcla de proteínas desconocida (Castillo, 2002).

**Marcador genético:** Cualquier característica utilizada como marcador de una variación genética dentro y entre especies o taxas. Estas características incluyen rasgos fenotípicos (color de ojos por ejemplo), productos de proteínas (aloenzimas, albúmina), y segmentos de ADN. Se podría utilizar un marcador genético particular como un rasgo diagnóstico como una herramienta para el control, como una ayuda para análisis sistemáticos, o en una gran variedad de maneras en la biología básica de la evolución. Diferentes marcadores moleculares (microsatélites, ADN mitocondrial, aloenzimas, RAPD's) tienen distintos enfoques, y diferentes ventajas y desventajas (especificidad, costo, facilidad de interpretación, etc...) (McDonald, 2000).

**Marcadores moleculares:** Segmento de ADN que se encuentra en un lugar específico en el genoma de un organismo y tiene propiedades inherente que hace que sea fácilmente reconocido cuando se utilizan herramientas tecnológicas tal como electroforesis (Hartwell *et al.*, 2000).

**Microsatélites:** Repeticiones cortas consecutivas de secuencias de nucleótidos. Las unidades repetitivas pueden ser di-, tri- o tetra-nucleótidos. También son llamados secuencias simples repetitivas consecutivas (McDonald, 2000).

**Minicírculo:** ADN circular, uno de los componentes del ADN del cinetoplasto (Castillo, 2002).

**Minisatélite:** Segmentos de ADN repetitivo utilizados generalmente como marcadores genéticos para la identificación individual o en análisis de parentesco. La tecnología de los minisatélites se basa en la hibridación de sondas. Las ventajas se encuentran en la no necesidad de cebadores específicos ni hipervariabilidad. Las desventajas incluyen la no utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la falta de especificidad del locus (McDonald, 2000).

**Mutación paso a paso ("stepwise mutation"):** La variación de microsatélites parece ser el resultado de un desapareamiento durante la replicación, el cual es el proceso más probable para añadir o eliminar una unidad repetitiva. Como resultado, alelos más similares en tamaño serán, probablemente, más relacionados. Este dato filogenético adicional puede ser útil para determinar las distancias genéticas y suponer la diferenciación genética (McDonald, 2000).

**Neighbor-joining:** Un método para construir árboles evolutivos (McDonald, 2000).

**Nucleótido: (di-, tri-, tetra-):** Subunidad de ADN o ARN que consiste de una base nitrogenada (en ADN: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T); y en ARN: adenina (A), guanina (G), citosina (C), uridina (U) ), una molécula de fosfato y una molécula de azúcar (en ADN desoxiribosa y en ARN

ribosa). Miles de nucleótidos son unidos para formar moléculas de ADN o ARN (Hartwell *et al.*, 2000).

**Número efectivo de alelos “ $N_e$ ”:** Este valor representa el número de alelos con una misma frecuencia necesarios en una población ideal para producir la homocigosidad observada en una población real (McDonald, 2000).

**OD:** Densidad óptica medida en un espectrofotómetro. Utilizado para asesorar la pureza y la concentración de AND (McDonald, 2000).

**Oligonucleótido:** cadena pequeña de nucleótidos. Sintetizados en un laboratorio como punto de inicio para el desarrollo de cebadores, o para ser utilizada como sonda (McDonald, 2000).

**Panmixia:** Ausencia de diferenciación entre subpoblaciones (debido a altos niveles de flujo genético, creando eficientemente una sola gran población sin una estructura interna). El adjetivo es panmítico (McDonald, 2000).

**pb:** Abreviación para “pares de bases” (nucleótidos) (McDonald, 2000).

**Plaques:** Dispersión de bacterias sobre todo el medio sólido de crecimiento, en condiciones estériles (Castillo, 2000).

**Plásmido:** Molécula de ADN extra-cromosomal y autoreplicativa, distinta a la de un genoma normal bacterial y no esencial para la sobre vivencia de la célula bajo condiciones no selectivas. Algunos plásmidos son capaces de integrarse al genoma del huésped y son utilizados como vectores de clonación para pequeños segmentos de ADN (de 50-5000 pares de bases) unidos al plásmido. Un gran número de plásmidos construidos artificialmente son utilizados como vectores de clonación. (McDonald, 2000).

**Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP):** Variación en el tamaño de fragmento de ADN, entre individuos, obtenidos al cortar con enzimas de restricción el ADN nuclear. El polimorfismo en los fragmentos de restricción es causado por mutaciones en el sitio de corte de las enzimas. En el caso del kRFLP el ADN utilizado es el ADN del cinetoplasto (Hartwell *et al.*, 2000).

**Poliploidía:** Que tiene más de un par de cromosomas homólogos. Una ruta común para la especiación en las plantas. Recientemente, se ha observado una diploidia en un roedor sudamericano (McDonald, 2000).

**Principio de Hardy-Weinberg:** Dadas ciertas suposiciones tales como no variación genética (tamaño de población infinita), apareamiento al azar, generaciones que no se cruzan, no selección y no migración, la frecuencia del genotipo en una población infinita puede predecirse a partir de las

frecuencias genéticas. Una población alcanzará el equilibrio de Hardy-Weinberg en una generación (McDonald, 2000).

**Prurito:** Comezón, picazón (Real Academia Española)

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica aplicada para la amplificación de ácidos nucleicos en un termociclador. Involucra el uso de un par de cebadores que inician la reacción. El producto final es una cantidad de ADN mayor que la inicial de varios ordenes de magnitud. El ADN amplificado puede ser entonces visualizado con tinciones o marcaje radioactivo, o se puede saber el tamaño en base a marcadores fluorescentes en un secuenciador (McDonald, 2000).

**Recombinación:** Intercambio de segmentos de genes por mecanismos durante la replicación del ADN. Las secciones intercambiadas son usualmente homólogas. La probabilidad de recombinación aumenta con el incremento de una distancia física (McDonald, 2000).

**Región flanqueante:** para microsatélites, las regiones flanqueantes son aquellos fragmentos de ADN fuera de la secuencia repetitiva consecutiva simple. Estas secuencias son utilizadas como pares de cebadores. Las regiones flanqueantes son generalmente invariantes a través de poblaciones o especies, pero mutaciones en ellas pueden provocar la presencia de alelos nulos como también una fuente potencial de homoplasia (McDonald, 2000).

**Replicación por desapareamiento:** Un proceso de mutación mediante el cual una simple secuencia repetitiva crece por adición o sustracción de una repetición. Por ejemplo el dinucleótido repetitivo AC crecería o disminuiría por la adición o sustracción de la unidad AC (McDonald, 2000).

**Secuenciación:** Técnica molecular para deducir la composición de un segmento de ADN o ARN, o el orden de aminoácidos en una proteína. Existen dos métodos alternativos para ello: Maxam-Gilbert y Sanger/dideoxy (Hartwell, *et al*, 2000; (McDonald, 2000).

**Secuenciador automático:** Aparato que determina automáticamente una secuencia de nucleótidos marcados pro medio de la utilización de electroforesis capilar y detección fluorescente o detección quimioluminiscente (Castillo, 2002).

**Sonda:** Moléculas de ADN de hebra simple o ARN de una secuencia específica, marcada radioactivamente, inmunológicamente o por otros medios, que son utilizadas para detectar la secuencia complementaria por hibridación. Algunos marcadores moleculares dependen de técnicas basadas en hibridación de sondas (McDonald, 2000).

**Stutter bands:** (sin traducción al español) Bandas secundarias formadas, por ejemplo, en microsatélites. Probablemente representan productos con un par de bases menos o más (McDonald, 2000).

**Tamaño del genoma:** El genoma es un término colectivo para todo los componentes del material hereditario encontrado en un organismo. El tamaño del genoma varía desde  $10^4$  pares de bases en algunos virus,  $10^{10}$  pares de bases en varias plantas, hasta más de  $10^{10}$  pares de bases en algunas salamandras y peces. Los mamíferos tienen aproximadamente  $2-3 \times 10^9$  pares de bases. Aunque la poliploidía puede aumentar el tamaño del genoma, la mayoría del aumento parece ser debido a una serie de eventos de duplicación (McDonald, 2000).

**Taq polimerasa:** Una polimerasa de ADN termoestable aislada del *Thermus aquaticus*, una bacteria. Utilizada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que no se degrada durante los ciclos de alta temperatura generada por el termociclador (McDonald, 2000).

**TE:** Tris-EDTA, un buffer utilizados comúnmente en los laboratorios (McDonald, 2000).

**Termociclador:** Equipo en el cual se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (McDonald, 2000).

**Timina (T):** Una pirimidina (base nitrogenada) que es componente de los ácidos nucleicos, un miembro del par de base A-T (adenina-timina) (Hartwell, *et al.*, 2000).

**Transformación:** Un proceso mediante el cual el material genético llevado por una célula individual es alterado por la incorporación de un ADN exógeno en su genoma (McDonald, 2000).

**UPGMA (*Unweighted pair-group method of arithmetic averages*):** Técnica para construir árboles para análisis filogenéticos. La información requerida son distancias (distancias genéticas) (McDonald, 2000).

**Vector de clonación:** Molécula de ADN originaria de un virus, un plásmido o de una célula de un organismo superior en el cual otro fragmento de ADN de tamaño apropiado puede integrarse sin provocar la pérdida de la capacidad de auto-replicación del vector. Los vectores introducen el ADN extraño dentro de una célula huésped, en la cual es replica de manera autónoma en grandes cantidades. Por ejemplo se pueden citar los plásmidos, cósmidos, bacteriófagos y cromosomas de levaduras artificiales. Los vectores son generalmente moléculas recombinantes que contienen secuencias de ADN de varias fuentes. Un vector debe tener las siguientes propiedades: ser capaz de replicarse en un huésped cultivable (levadura o bacteria), tener un marcador dominante de selección que permite su detección (genes de resistencia a antibióticos), tener uno o más de un sitio de restricción que permita cortar y unir el fragmento de ADN de interés (McDonald, 2000).

**Visualización:** Técnica para estudiar la variación entre segmentos de ADN (marcadores moleculares). Estos métodos incluyen marcaje con radiación (exposición de geles a rayos X) y varias tinciones (bromuro de etidio, plata, etc...) (McDonald, 2000).

**Zoonosis:** Enfermedad parasítica de animales salvajes que es transmitida por especies silvestres hacia otros animales (Monteiro, *et al.*, 2001).

## B. Protocolo para aislamiento de fragmentos de ADN de *Trypanosoma cruzi* ricos en microsatélites

Se digirió el ADN del parásito con la enzima de restricción BstU I obteniendo fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases. Se unió el “linker” denominado SuperSNX (SSNX; 5' GTTTAAGGC CTAGC TAGCAGAATC 3' 5p GATTCTGCTAGCTAGGCC TTAACA AAAA 3' ) a los fragmentos obtenidos en la digestión, de tal manera que se incorporó una cola de adeninas a cada extremo. Se obtuvieron los fragmentos de ADN ricos en microsatélites. Se llevó a cabo la hibridación entre una mezcla de oligonucleótidos específicos marcados con biotina (se utilizaron tres mezclas diferentes de oligonucleótidos que representan microsatélites específicos de *Trypanosoma cruzi* según recomendación del laboratorio), utilizando el programa denominado “Oligohyb”. Este programa consistió en la desnaturalización de los fragmentos de ADN obtenidos y de los oligonucleótidos específicos marcados con biotina, a 95°C, por 5 minutos, seguido de la hibridación de ambos reactivos mediante un rápido descenso a 70°C, seguido de una disminución de 2°C cada 5 segundos, hasta llegar a 50.2°C, por 99 ciclos, bajando luego a 50°C por 10 minutos, seguido de una disminución de temperatura de 0.5°C, cada 5 segundos, hasta llegar a 40°C por 20 ciclos y, finalmente, una rápida disminución a 15°C. Una vez unidos a los fragmentos de ADN ricos en microsatélites, con las sondas marcadas, éstos se separaron del resto del ADN genómico capturándolos con perlas llamadas “Dynabead” unidas a streptavidina (los fragmentos de ADN, unidos a los oligonucleótidos específicos marcados con biotina, se unieron a las perlas); se descartó el sobrenadante y se lavaron las perlas con soluciones de astringencia. Luego de una rápida desnaturalización a 95°C, por 5 minutos, se capturaron las perlas unidas a la sonda marcada con biotina y se precipitaron los fragmentos de ADN, ricos en microsatélites, presentes en el sobrenadante, mediante la precipitación con acetato de sodio y etanol.

### C. Secuencia de clon E.3.13 para pre-análisis

CNNTNGGTAACAATATATAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGT  
 CGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTGTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCGGTTCCA  
 CTTAACGACACGCAGGTGATTCGATCAGGAGCGCCATTGTACACGTATGTATGGTATGTACACG  
TATGTATGGTATGTACACGTATGTATGGTATGTACACGTATGTATGGTTTGTACACGTATGTATG  
GTATGTTACACGTATAGTATGGTATGTGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAATCGAATTC  
 GGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC  
 AATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACGGGAAAACATCCCCCCNANNANTCCNCCNCN  
 NGNTGNCCCATCTNCNNCNCCTTNCCTGTTNTNTNCNCNCCTCTCNTTCNCCCCCNCNTTTCC  
 TTTTNCNCCCCCCCCCTCCCCTCCCCCCCCCNCNNTNCCCCCACCCANNCCAATCCACCCCN  
 CCNNCNCGGNNNGNCCTTANGNTTTNNCNTNTNCNTNCNNTGNTNNCTCCTTTTTCTNNNNC  
 TCCCCTCTTNCNCCCCTCCCCCNCNNTCCCCTTTCCCNCTTTCCCATCCCTCNCCTTNCNCCN  
 CCCTATTTNCTCACACACCCNCCNCCNCCCTCNCACCCCNNNNCNACTNTNCCNCCCTNCCC  
 CNNTCC

Leyenda:

**Ligador SSNX**

Secuencia de microsatélite

$[(TATGTATGGTATGTACACG)_3(TATG)_2N_{11}(TATGTATGGTATGTACACG)(TATGTATGGTATGT)]$

**Cebador M13 forward**

## D. Secuencias de clones positivos por PCR secuenciados

La nomenclatura de cada clon positivo se basa en la siguiente regla: la letra E y el primer número corresponde a la elusión número y el segundo número corresponde al número de clon aislado.

### 1. E.2.1 (385 pb)

ACCGTTTCTTCTGTTTTTCATTTCACTCTGCGTTGACGTGTTGTTAGTTTTGTGCTGAAGACTGCA  
CGCAAGTGACAGGAGTGATGGCGATGATGACTGGCCGTGTGCTGCTGGtGTGTGCCCTCTGCGTG  
CTGTGGTGCGGTGCCGGCGGTAGATGTGACGAGGTGGTGGCGAGAGCGCCTGCCGGTGGTGTGT  
GGATAAGAGCGAACCCTGGTGAATCACAAGAAATTTGGAGCGTCTCCACAAGGATCACAAGAA  
TAAAAGATGCGGCCAGTTGTT-AAAAGGG-AATCA-ACACCCG-C-ACCTCCCACACCT-  
TCAGATGGAGAGGATGATGATGATGATGATGATGAAAGAGACGGTGTGGCCAAGAAGACGGAAGC

### 2. Clon 31 E.2.3 (521 pb)

GCCCTCCGTGAGGGGTGCCGACACGACGGACCGCTCTCGCGGTATGTGCATGCCGTTGAGCCTTG  
TGTGCCGCTCCTGTTTGCTTCTCCCTCTCCATCTGTGTTTTGGTGTGCGGCAGGGCTGTGTGT  
GTGTGCCCTGCTGCCGTGGATTGGAGTGTGTGTGTGCGTGGTGTGCGGCGTACGGTGCCTGCTG  
GCTGCTGCCCTCTCCTCATGTGGTGTGCCCTCTGTGTGTGTCTGCTGCACCTCTCGTCTCCCTGT  
TGCTCTCCATTTCCCTCACTGTGCAGATCAGCTCCACACCCTGAACGACCGCACTCACGATGAT  
GATGACGTGCCGTCTGCTGTGCGCCCTGTTGGTGTCTTGCCTGTGCTGCTGCTCGTCCGTGTGCG  
TTTCAGAGGAAGCTGCCACTACTCCCCAGACGACCACGACGACCACAACAAAACCACCTACT  
ACGACCAGACAACCACGACAAAACCACCAACCACGACCACCACCCTACAACACAGGCACCAAG  
T

### 3. E.2.7 (405 pb)

CAGAATCGATTTCCTTATCCATCCATGACGCGGTGCCTCACTCCACGCGGTACACGGAGAGTGCA  
CCATTTTCGTCAATACAAC TTATTTCTTCGTCCATCCCTTACAAATGCTTCTGTTAGTGATGGGCCT  
TAGAGCACAATAGAATAAAATGGACAATGCAGTAACACCATAACACCGCCAGTACAATGGTTTT  
CTCATACCGAGGCAGTTTTCCAATTATGCCTCGTATGCACACACACAATTAACATACCATATAGA  
AATCAACCAATGTTTTTACCAGAAACCAACAACCCCAATCCCTCCCTAATTTTTCTTCTGTCTAC  
TGTTATGTTTCGATAGCGTTGGTCATTTTTGACATTTGTGTGCGATATACTGCCGTCTTGTGCTGG  
TGCGCCCGCACCGTG

### 4. E.2.9 (387 pb)

ACGATGATAAATCCTCGCGTGCAATAATTTCTTCCACCGTCGTTGATGAAGAGGAGCACAACTTT  
CCAATGCCATCGAGGCTTGAACCAAAAAGGTTACTGAGCATGACAGTTATTTTTCCCTCCTCCTC

GGAAGAGCAATATAACTCAAATACTGAGGTATTGCAACCAAAAATTCGTTAATGGGCTGGAGGGT  
 CCTCTCTACTCTCGGTGCGCTCTCCCCAACGTATACGTGCCCTTTCAGTTCCTTGGGTGAAG  
 CGCGCGGCAAATAAATAAATAAACAAAAATAAAAAATAGAAAAAAAAAAGTGATAGACAGAA  
 AGAAGACGCCGGCATTGCTGGTAAATACATGTGTGGGTGCAACCAGGAATAAAGAGGGAAAA

5. E.2.10 (220 pb)

GTTTCACGCAAGTAGAGTGAAAATAAATAAAAAA-----  
 C---GTC-----

TTTTTTTTTTGTGAGGTGCGGTGCGTCTGTTGAAAAGAGAACTC  
 AAATAAAGTTGAGAGGTAAAAAAGAATTTAAAAAGACAAATTCATGAGGGTTCAAACACCACTA  
 AGAAAAATAACAGAATGAAATGTTGCTTCGGGTTTTAAAAATGATGGTTCATTGCCATTATTAA  
 TCCCTTTTGGTATTTCTCTTTTTGCATGCTTGTGTGTGTGTATGCGGGTTTGAAGG

6. E.2.13 (398 pb)

ACTAACGTTTCATGAAGAAACACTGTGGAGCGACCATGTGTTGTCCTCATTGGCTGTTGTTTGA  
 CAAAAACAATATTTTACCCCTTTGAAGTCACAAATGCCATGGTAAAATGGACAGAAAAAGCCACT  
 GAATTGCAATCTTGGGCAGTTATCTCCTCGTCTAATGACCAGTGGCCATGTGAAAACCGATAGAG  
 TCGAACCTGCTTACCACGGCAGACACAAGCCAAGTATATTCCATACTGCCAAGGGGCCCATGCTA  
 GTTGTGTACAGGGGAATCGCAGATGATCAATACGCACTGTGTGTTCTGCAGGGTCCCCTGCGAC  
 TGTCCCCGTTTTCCGCCTGAATC

7. E.2.14 (335 pb)

GGTTCGCTTTCCTTCAGTAACTCGGGGAGAGAGGCGGCAACAGTCTGCATCAAATGATCCAACCT  
 CTCCGCTTCCGCAATCTTCTCCTCGCGCACAGACCCGACCCGTCAACAAGCGGTGCAACAAATG  
 CACTTAGAGTCCGCAGAGCCGAAAAGCGGCGTTCAATGTTTGACCCCCAAGCATGTGTATATAC  
 AACGGAAACAGCTTGTTCACCACAGCACGGCGGTGTTCAAACACTTTCCTGTTCTGTGTGAG  
 AAGTCCCACCACCCTGTAAATTCCTCTTCATATGTGACATAAACTGGCGAAGACATCACCTTCT  
 CCAAACATGT

8. E.2.20 (239 pb)

GCTTCTGGGTTATGAACGCGGGGGACACCCAATACTTATTGCGAGGGCGCCTACACTTAATTCCTT  
 CTACTGCGTTTTGAGTAGCTGGCGGGGAATTCGGCTATATTGATGTTTTCGATCGACTCTTCTGAA  
 TGATCTTCAAAGGGGTTGAGTGTGTGATCCCGGAACGGTTTTTGTCTGCGGGCCGTATTTGATG  
 ACTGCAATTTCTTACTTTTTTTTTTTTGGCGACATGGCATTGGAGGGTCCGCATCGCCACTCAA  
 TTTCCCTGT

9. E.2.28 (369 pb)

GCTTCTGCACACGTCAATGAAGTCGGTTGTGCTACGACTGAAGGAATTGGAGGCAAGAATTGGTG  
 CATTGGAGTCTCTAGGATGTGATGAGCAGCAGCGCTGATGATGATGATGGTGATGCGTATTTTA

TGTGAGCCGTTTACGGTTGTGCGTGTGTATTATACGCCCATGTGTGTGCATTTTGTGACTCTCTT  
 GTTTTCTTATTTTTTGTTTTTATTTTTATTTTTGGCCACTCGATCTCAACAAAAAGACAACAAGA  
 AAGGGGGTTCTCCCACTTTTTTCATTGCTGGTGCAGAAGTTATAGCAAACATGCGGCCTATGACGC  
 TGCCGTCGCGCCTGAGTGGACGCTCTTTTCACTCGCAGCATCGT

**10. E.2.30 (250 pb)**

TGTTTCGTGTGCGTATTTTTGAGAGGGATGTTTTACTTATTAGTTTTTTTTTTGACTGTTTCTCC  
 AATTAATGAACGACTTTTAAAATGGCGGCAGGGTGTCTTGTCTTTATGGACTAGTTTTTCTGTT  
 TTTGGCTTGTTTTTTCTTTTGGCGTGCTTCGGATTATTATTTTTTCTTCTCTTTTTTTTTTTTT  
 TTTCCCgCGTGTCTTTGTTTGTGTCTGTGGGATTTGCTGTTGACATTTAAAATGT

**11. E.2.88 (345 pb)**

ATTCCACACCTGCACGATATTGTGATGCAGGAACCGGTTCGGTCTCGCAGTTCACCGCATTCTG  
 CAGTATTCTCTGCTGTCTCCTTGTGGAGGAGGCGCAGCAACAGCAGCCATTTCCGCTAAAACCTGC  
 CGCCGCCCTCTTTTAAATGAATTTAATCTCGTTGGACGTGGGTCTCGTATTGGTGTGTGGCTG  
 CCACGAAGATCCCCACGTGTTGTGAGCGGCACGTTGCGCTCTGCTGCAGCTGATCGTGGCACAGT  
 AACCCTGGTGGTAGTGCCGATTGTGCCAAGAGGGCCAATTTCACTCATGTGAAGTATGCTCGC  
 CTGGTGTCACTCTAgCGCGT

**12. E.3.6 (298pb)**

ACTCAGCAGTGCAAACCCCTTTGATGCCTACAGCAAGGAGGCGCTCACTGCCCTTGCTACGAGGG  
 ACCAAGGTGAATAGTCTGCAATACTATTTCAAATGTCTACGCTGGAGAAGAGGCAATACAAAAT  
 GGATGAAAAAGAAGAGGGAGGGCTGTAGGAAGACGTTTTTGACTGACTGCTCAATGTAGAATCT  
 GTTACTGTATTTCTTCCATATGTCTGTCTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTATTTATTTCT  
 CTTCTCTCCTCGTGGATGACGTGCGCAAATATGAATG

**13. E.3.8 (345 pb)**

ACGTCCCAAAACCGGGGTGCGTTCCGCTCTCTCATATTGGAGGTGCGCCATTGGCACTATT  
 TCTTTAACATTACACATTTAATTTCACTCCCGTCTTCTGATAAATTATATATATGGAATGTATGT  
 GCATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTAAAGTGTATGTGTGTGTTGTTACATTTATTTATTT  
 ATTTACATGACAACAGGTGTTTGTCTGGACGAACGTTCTTCGATCCCATGATTGCTCAAAAATTT  
 CAATATGGAGATGGCCTCTTCATAACGTTGAATAGAAATAGCAGAACGAAAAAAGTTGTTGCA  
 ATGATTTGACCCACGAAAA

**14. E.3.14 (298 pb)**

ACTCAGCAGTGCAAACCCCTTTGATGCCTACAGCAAGGAGGCGCTCACTGCCCTTGCTACGAGGG  
 ACCAAGGTGAATAGTCTGCAATACTATTTCAAATGTCTACGCTGGAGAAGAGGCAATACAAAAT  
 GGATGAAAAAGAAGAGGGAGGGCTGTAGGAAGACGTTTTTGACTGACTGCTCAATGTAGAATCT



CCCCGTGCAGAAAGGGCACAAAAAATTATCTCTGCTCTGATACCGCCGTAACCTGTCATGGTAC  
AACGCCACACATGCAGGGTGGACACCAATTCCCCGCAGACGATAGCGCTCCAGCAGCGTCTGCC  
GGCGTTGACACAAGATACGCAGTGCAAGCGCACCGCAATACGCCACCAACGGGCCCATCGATCGG  
TCCTAAAGGACTTCTTCCCTTTATGAGAGCCCGTGTAACCATACGGTTCGGCCTCGCCAACACCT  
GGTTGTTGGAGGAAGAAGAGGAGGTGCTGGGTATGGAACCTCTTTTTGACGTCTGCGGGGAAGA  
AGCATACCGCCCTTCTTCTCTTCCCCTTACCCCTTTTGCCTGCGTGTATTTGTGTGTAATGCG  
TATGTATGTATGTATGTATTGCAAGCGTGGGACACGGAGTAAACGT

**19. E.3.30 (299 pb)**

CTATCGCCTTACACTCAAACACATACATACATACATAAAGGGAGAGAAGCATTATAAAGGA  
ATTGTTAATAAACGCACGTGTATCAGTATTGGTTGTTGTTGTTTTAATATATGCGCAGGGGTGG  
TGAGTTCATGTTGAGCGTCCCATCTTCTCGACTTTTTGCGTCGGGGCGGCAATTCACGTGCGTT  
TTGTCAGCCACATATATGCGACTTCATGCATAGGCGTTCAACTGCGAGCCTCTATGAGAAGCAGT  
GGGCAACTGATAGGAATGACAACACATGGATGCTTGTGT

**20. E.3.37**

No disponible

**21. E.3.62 (650 pb)**

ACGAATCCGGGAAGACAAAGTCCATGTTCCCTTCCCTTCCGCGCCACAAATACACGCACTCA  
ATTGCCCTTCTGTCTATTTCAACTTCTCGGGTCTCTCCACAGACACCCTCCTCTATACCTGCGG  
TGTTTAGGGATTAAAGAGGGCGATGGACAAAAAGGGGGCAAACAAAAATAAAATAATGAAATC  
GACCCGTGTTGTTGTGATCCCTCGCGTCTGAGATGTTGCACAACGTCCCATTTCCACCAACAC  
CGCCAGCAATGACATGCCAGTTCGAATGGGACAACAGTATAAAAAAATTTATAAAAAATTTGCA  
TAATTATTTCTAATGCCACCTTCGTTTCTTCTACCAGTCTCCTTCAAAGTGCTCACACGCCGT  
AAGCAAAACGAATAGTCCCTCATTTTCCCTTTTCCATACCTCACTCACACATACATAAAACAAA  
CAAACACATATAAATGTGTGTGTGCACTGTCAATTTACTCCGCAGAGCGCTGCAGGCATGGCTGC  
GTATCACCTTAGCGCAGCTTCACTCCGTGTCCTCAAGGGCGTCTGATGGCGCACACTGATAATCTT  
AAGCGCACTATCCGCTATCCTATCCACAGGCTCCCTGCTTACACTCACCTTACCACGCTTAGGGT

**22. E.3.63 (259 pb)**

ACACAAAGCGAAAAGGGAAACGAACAGGCAAAATAAGTTGTGTGTTGTGTGAGTGAAAAGGGGAA  
ACTGTCAAGAAACAACACGACAGGAAGAAGTGAAGGAGCGTGAAGGAAGACATATAAACGTAAAGA  
AAAAAGAGAGAAACAGGGAAAGAGAGAGAAAAACAACAAAACTACGAAAAAAGGATATTAGG  
CCGTGAAGAGGGAATAGCCGCATCCGTTTTATTTGGTGGCCGGTGTAGACCTGGTAACGAAAC

**23. E.3.71 (556 pb)**

ACCGTCAATCATTTCCCTTATGGGAGACGGTTGGCGCAACTGCTGTTTATTGATATATTGGGTGCG  
TTTTGGAGTGAATTGGTGATGCCATTTGACGTGTGAATATTCTCATATTTGACAAATTACATTTT

CGAGGCACTGCTTTTGTATTATGATTGCCTCTCGAAAATTATTCTTTTTTTCTCCGCAGCACTCA  
CACAGAGTCTCAATTCTTAGGGTTTTTTTTTATTGTTCAAAAACAAAATACTGAATGGGTTTTTT  
AACGGTTCTCTCTCTGTGTGTGCGTGTGTTGTGAGATAGACATAAAGTTCAC TGAATGGTGGC  
TTCGATGGAGGATCGAGTCTGTAAATTTTTTTTTTACTTTTTTATTTTTACCTTTGAAAACGAC  
AGTCATTTTTCTGTGAGCGTTTGAGAATAGTGCTAACGAGAGGGCTGGCCGCCTAACTTAATACA  
TCCTGATGAGAAGATATTACTGGACGATTTATTTTTTATTTTATATGAATCTTTCGATGATTGCG  
ACGGAAGAAGCGAAGGAGCTGACAGCGGTAAGAATG

**24. E.3.72 (436 pb)**

GGTTCGGCGGAGGCAGAGGCGGGCCGGTCACCGCAGTCAGGGAGGGACGGCACCA  
CCGACACAGAGGGTTATTTGTGATCCGCAGGGCGCGTGCAGGCCTGTGGAAGAGTGGGC  
AGGTGTGCGATCGCGCCTGTGCGCAGTGCCGCCACTCGGGGCACGATGTCCGGGTGCGTCCAGGA  
ACAGAGTCTCGCCACACCGGCAGGCGCCTGTACGCGGTGTGCGCGCCTTCCTCTTCCTCTG  
GCATCCTTCCATTATAACCGCTCCACTGCAATGAGGAAGTCCACGTGCCAGGCATTGACGCAGTC  
CTACGGGAGGGATCGTGCAATCGTGCCATGTTTGTGAGCGGCCTCACTGCGTGGAAATACCGCAGT  
GTCATGAGGAAAATGTAAAGCCTGCTGTGTGCCCTCAATCCACCAGCGAATGCGGCACGGT

**25. E.3.82 (383 pb)**

ACCGTTTCTTCTGTTTTTCATTTCACTCTAGCGTTGACGTGTTGTTAGTTTGTGCTGAAGACTGC  
ACGCAAGTGACAGGAGTGATGGCGATGATGACTGGCCGTGTGCTGCTGGTGTGTGCCCTCTGCGT  
GCTGTGGTGGCGGTGCCGGCGGTAGATGTGACGAGGTGGTGGCGAGAGCGCCTGCCGGTGGTGT  
GTGGATAAGAGCGAACCCTGGTGCAATCACAAGAAATTGGAGCGTCTCCACAAGGATCACAAGA  
ATTTAAAGATGCGGCGCCAAGTTGTAAAAGGGAATCAACACCCGCACCTCCCACACCTTCATGAT  
GGAGAGGATGATGATGATGATGATGAAAGAGACGGTGTATGGCCAAGAAGACGGAAGC

**26. E.3.96 (554pb)**

**(igual que clon 45, salvo por algunas bases con clon 45)**

ACCGTCAATCATTTCCCTTATGGGAGACGGTTGGCGCAACTGCTGTTTATTGATATATTGGGTGCG  
TTTTGGAGTGAATTGGTGTGATGCCATTTGACGTGTGAATACTCTCATATTTGACAAATTACATTC  
CGAGGCACTGCTTTTGTATTATGATTGCCTCTCGAAAATTATTCTTTTTTTCTCCGCAGCACTCA  
CACAGAGTCTCAATTCTTAGGGTTTTTTTTTATTGTTCAAAAACAAAATACTGAATGGGTTTTTT  
AACGGTTCTCTCTCTGTGTGTGCGTGTGTTGTGAGATAGACATAAAGTTCAC TGAATGGTGGC  
TTCGATGGAGGATCGAGTCTGTAAATTTTTTTTTTACTTTTTTATTTTTACCTTTGAAAACGACA  
GTCATTTTTCTGTGAGCGTTTGAGAATAGTGCTAACGAGAGGGCTGGCCGCCTAACTTAATACAT  
CCTGATGAGAAGATATTACTGGACGATTTATTTTTTATTTTATATGAATCTTTCGATGATTGCGA  
CGGAAGAAGCGAAGGAGCTGACAGCGGTAAGAAT

## 27. E.4.8

No disponible

## 28. E.4.10 (331 pb)

CGCAACTCACATATTTGGCGGGCTGGAGAATTGGCCAACAGCTGTCATGATGCTTGACCGGACCA  
 CGCAAGGCCTCCATGCCATTTGGCGTGGAAGCGATGTGAAATGGGCCGAAAT TACAAGAGAGCTT  
 ATTGCTTTAAAGGGAAGGGAAAATGTCAAATAGAGAGTCTGTTACACTGTGCGGGTCGTAAACCG  
 GGGGCGCCCAACATGCACTCACATCCGCGTCATTTATCCTGCATCTGTTTCCCTTGGTGCGGCA  
 TACATGTGTAGACCTGTGTGTGTTTGTGTGTGCAATGAGGGGATGGATTTGCCATTTGTTTTTTG  
 GTGCTG

## 29. E.4.14 (377 pb)

AATTCGTGTGCAGCGGAGGGCGCAAGTGTCCACGCGGCAACCAGGTCCTCCTCACGGAGCCGCA  
 AACCCCCACAGTCCCAACAGAAGCAGAAGCAGCGATGGCAGCAGTCCGCTCCAGCAGAATTCAA  
 GCTCACCTCTGACACAACAAATTGTATACCCTCAGTCCAAGAGGTATTCCTCTTTGCCGCTCCAC  
 TCTCACTCAATTCTTCAACTGCCATGGGGGTTCACTGTTCATGGGCACCGCTGGAGCTGCGGAATT  
 TTTCTCTGGACAGGCACAGCGGCCCATGCCCTCCACTTGTGTTACTGGAGCTCCCGTCGAAGCGG  
 GGATCCTGTCTTTGATTGCAGTGCATCTCAGTGAATTCAGTGGGCGATTGT

## 30. E.4.16 (445 pb)

ACTGATCTTGAGTAAACAAACGAATTCAAATTGATGTCCGTCCCAACTGCCACTCCTGTTTTCGC  
 CAATGGCGTCCGCAATGAGGCTCAGTTTTCAATCCGGGAGAGCAGCATAACATCCCACACCAGGTCC  
 CCTTGACACGGACGCAGCGCCACCACCGCCGCCACGGAAGCGCATCCATCGGCAGAGACCATGCC  
 AATTTGGCAAATGGCCGCGGGCTCATTGCCACACCTCGAGGAACGGCGTAGTAAATACGGATTT  
 GGAAGCCACTCCACCTCCTCTACACTGGNCAGAGGAAACACCAAAGGAGCCGCAATCTGAGCCT  
 TGATTTGGCATCCCTTCTGTCTGGCTGCGACCTCACCAGCGACGTTGTTATCCTCTGGGGGCATC  
 ACTATGTTTTTTAACAATGTATTGTGGCCGCACACGAATATACCGCGGAATC

## 31. E.4.19 (496 pb)

ACGCATCGCGCCGCATGCACCATCCGCCAATCGGCGGAGGTAAATCATGAAGTAATCCGTGA  
 TGTCAATTTGCAGCAATGAACTCGCTGCTCGGTAACACCCAGTGAAACGCGTCGTAGTGTCTG  
 CTCTGTAAGGCCTGAACGACGTTGCCTTCGTTGGTGGCCATCCGACCTGGCCCTCTAAAATAGA  
 CAACAAGGAAAAAATAAAATTAGCGGCAGCCAAAATCCAAAAAATGAGGAGGGAGAGGGAGGAA  
 GACAGCGGCCTCAAACCCCTTCTTTTTCGTTGTGTTTCTGTGTCTGCAATTCTTCTCACCTTTC  
 TATTAATAAATGAAAACCTCTAAACCAATTCGTGTTCACTTTCCTCTTCCCTTTCCTCCGTCCA  
 CGCAATCCATTCATATGTGTTTCCTTTTTGCGTGCATGTGTGTGTCTGTGTTTTTCCCCACGTTT  
 AACACCACGGTGGGAGGGGGGAACACACATG

## 32. E.4.35 (451 pb)

GATTCTGCTAGTACTCTGCGGGCCGCACTCACGCGCCGATGAGAGGGCTGAGGGGAGCAGCAACG  
 CGCAGATAACCCATGAAATATAAACGGTGTGCTGACACACGGAGGGTCGGACGGTTGAAAGACAT  
 TTAAATATCTTTTAATTTTATTTTCGGACAAAATATTTAGACAGTTGCTGGAGCAACATGGTATT  
 TAGGTGAAATTTTCGTGTGGTTTTTCTTTTTTCTTTTTCTTATTATTGTGTGTGGCCGTAGTA  
 GAGGACGATTTTTTTCATTTTTTATGTTTTGTTTTTTTTCTTTTTTAAAGTGTGAGGGGTGGA  
 AGGTGAAGATGAATTTTTTAAAATTTCAATATTTTTTAAATGGATTGCCGCTGCTTTGGCTGCC  
 GTGCAATGTCATGAGCCTGAGCAGTCTTTTTCTCTTTATTTCTGCCATGCACCTCCGCTGT

## 33. E.4.36 (615 pb)

TCTTCAGACTCCCGCAGTGCACATGACTCTTCCCTATAGCCGCCTGAATCCGCCTCAAACGCTT  
 CATGTGTGCAACCAGTTGATTATGCCGTTTCGTGATATTCAGCAGGGTTTCTTGTTCCTGCTTGA  
 TGCACCTTTTGATGGTATTTACTTCCGCTGCAGCATTCCGCATCTCGTGCCAATTCCTCCACGGGT  
 TCTGAGACGTCACTATCATCATATAATCGCCACCATCTCCATGACTATTATTATAAGCATC<sub>c</sub>AT  
 gCCTTGTTTTTCTCGTC/GTCATTACACTGTTCTGTATCTGCTGCAAAAATGACGG/CAAAGAA  
 AAAGATAGCGGCGCGGT/GTTGGTGGTAAAGACTCCAAGAAATCACCAGTTATATTGTTCCGCA  
 GCNAAATTGAACGGAGGTGAGCAGCGTATTTCTGGCCGCTTTGAGgCTCGGCGTCCTTTGCCGC  
 AATATTACGAATCAATCGCTCCATCTCCTCCGTGTTGGCAAGCTCCTGTGCTGCACGCTGTTGAG  
 CATCTGAAGCGTGCGCATCCCTCNCGCGCTGACGCTCCGCCCTACATTTTCCGTGACGTGAGAAA  
 TCCACGCCATTTCCGCGTCCAGCTCCATGT

## 34. E.4.37 (675 pb)

ACTCCTCCCTGCCACGTCCAAACTACACACACAAACACATGCAAACACACGACACTGTGAATG  
 CAGAGGCTGTATGAAAAGGGATTTGAACCCCAACGCAGGTGAGTTTACCCCGACGGGTGGGCGAC  
 TCACCCCAAAGCCTCATTAATGAGGGGGTGTAGTCTTCTTATCCTTGCAAGGTGGCTCCGCA  
 CCCGCCGAGCTTCTTCGTCCCAACAGAATAACGCAAAATCCTAATGATAGAACGCCCTTTCAAGT  
 TTCCGAGGGCCTTGTAGAGGCATGCTACTTTGTGCCAGCGACACGCTTCTTAATGGATTGTCCGG  
 CCGCATTCTATGAACACCCGGAAGCCACTAAATGTAAGCACATGGAATTTGAACGTCTACTGCGT  
 CGTTGCTTTTTTGGAGCACATGAAACCAATGAACTGAGCATCTCCTTGGCTTCTGCGTCTGGTCA  
 AAATAGACCATTCTGGGTGTGCTATCTACGGCTATTTTCGGATGGCGCACGACGTCGTACAGG  
 AGGTTGAACTTGGGACGCCCTGTCTTCCACTCACTGTTACCCCCGGCGGCGGAGGCGCTTCA  
 CTCGCAATGCCGATGATTCCACCTAACTTGACAAGCTTCACAAATAACTCGACGGAGGAAGAAAAG  
 GCAACGTGAATC

## 35. E.4.39 (441 pb)

GTTTCTCGACCTTGCCTAGTTTTTATCTGTTTTTCCATTCTTTTTTTCCCTTCTCTCTGTTTCC  
 GTTTTTGTCTCACTCCTTCTCTTACCACCATACTTCACTGCATGCAGGGTTGCTGCGCCTGCCTC

TGTGGGATGGAGTTGGGTCTGTGGAATTACCATTTTTTACTTTTTATTTTTCTTTTTTCCCTTTTT  
 TTTAAAAAATTATTATTTGTATTGCAGTGGACAATTCATAGAATCATTTTTGTGATTTTTTACTG  
 GCGGTTTCTATGAAATTCCTTTTTGTTCCCTTCTCTCCCTTTGAGTTATTTGTTTGTGTTGCTGCAA  
 ACTGCGGTATATTTATAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAAAATAATAATAAAACACACAAAAAGG  
 GATAAACTCCTTATTTGGTTGAAAAGCAAAAAAAAAAAGCAAAGGAGGT

**36. E.4.40 (466 pb)**

ACTCTCGATTTCTGGGCATGAGAATGACGATAAGGCGTTGTTACGTGCGCTCACTGCAACCACT  
 GCCTTGGGGATTTAAGAGCGGCAGAGAAAGACCTGAATACCTTGGAGCGTCTCAGCAAGGATGGA  
 AACGTGCCAATTGATTCAGCGGTGCCAGATCTACGTAGACAAATTGCGAAAACCAAACAACAGGC  
 GTTGGAGAAGGAGCGCAAAATGTGCGCAAAGATGTTGCTCAATGAACTACATAAAGTCCGGCTG  
 AAAAGAATCATCGTGTATTATTTGAGTGTCCAATTCTGCTTCACATCACGCAAGAGTGTCTCAC  
 TATTTCTATCTGGATGTGCGCCAAAACCTTTCTCTCGCTCTCTCTCGTTCTCTCCTATATACAC  
 CTAAATTGGACAGTATAAACTACATCCGTTTGTCTGCATGCGTTTGCTTGTTTTTCTTTCCC  
 CCTTTGGAATG

**37. E.4.43 (499 pb)**

ACCTTCACTACCCACAGCGGCCCGCCCATGTAATTCTGCTGCGTGTSGACGCCGGTGCCTCTCTA  
 ACAACTGAAATGCAAGCGCACTTGCCGTCTCTCTGCATTACTCAGAGGAAGGGTGGCAAACGTC  
 TCCTCTCTTTCCCGTGCACACTGCTGCTGCATGACCGGCACGCTGCCATGCGTGCGCCGTGCGAG  
 CCGACCAAAAATGACACGAGAAAACCTCATTCCTTTCTTTAGGCTTGACGCACCTCGCAGCAACA  
 GCGAGGCATTCAAATAAGTAACAAAGTGCGGAAGGCGGACGGGTAAAGAGAAGTGAGGCGCCA  
 CACACACACGGAAGAGGATAACAACAACAACAACAACAACACTCTGACGACTACTCGTCAA  
 GAAATAGAAGCCAATATTTACCCCTCACGCTGGAAGAATGCGGCAAATCAAATAAATATCGACCA  
 GCGACAAACACAATCTTAAATCCACACACAAACACGCTTGC

**38. E.4.51 (665 pb)**

ACGCACACACACACACGGAGAGAGAGAGAGAGAACAATTCACGCATTTGTACAATGCTGCCATCA  
 GCGCGTGCTTGCTGCTGCAGCGAAGATAATGTTTTCGTTTTTATGATCTGTGTTATTTCTGGGTGC  
 CGTCAACGGACTTAATAAAAACGTTTGACGTCTACTAACGACGCTTCTCTTTAATTAATGATGTTG  
 ATTACGCCCCATGAAATTAGAAAAACAATAAATACGATGGTATTTGATAAACTTGACGCAAAAGA  
 AGAAAGATGTGGGTCATTAGCGGCAAATGAGTCTAAAAGACGTAATAGACCGTTCACTCACATTT  
 CTAACCACACACTTCATGCATCATGGATACCGCTGCCCTT

**39. E.4.57 (400 pb)**

ACCCAGCAGGATGCTCCGCCAAATTTCTTACCCTTTGCCGGGAGGGCCACAGACTTGATTCCAA  
 TACGTCAACGACTGCACCAGCCGCTTCTCTGTGGCGAAAACAGGTGCGGATGCCACTCCTGTGA  
 ATATGAGCGACAATTTTGGAGCTTCATGAGGACGAGGAGGTGACAAAGCTGGCGATTTGTGAATCTT

ATTGGGGAGCGCAAAGAGTTTAGGGTAAATCCCAATCGTCACACCGTTGGGGATGTTTTCTTTTT  
 GGCGGCGGCGCACGCACAACCGGGGGCGTTGGCCTTTCAACTCATTGCCCGTGACGTTCCCCGC  
 GTCCATTGACGGATCGTTCCTGACGATTGACGTTGCTAATTTGAGGAATGCCACGGTGATTATG  
 CGCCGAAAT

(No se encontró el SSNX en el extremo derecho)

**40. E.4.65 (432 pb)**

TTTTCCCGTCCCCTCCTCCAATCGCGGCCGCGCTTCTTTGCCTTCTTTTTGGCTGCTTTGACC  
 CGTTTTTCTGTTGCCTTGCGTTAAGAGCCTCCACTTTGGCTTGATGCGCCTTTTCTCGCTCCTT  
 CCTTCTAGGAGACGATCAGCCTCAGCTTGGTGACGTTGCCGCCGCTCCGTTTCCCGTTCCCTCCG  
 CGAGGCGGGCATGCTCGTTCGTCTTCCACCTGCCCCAGCAATTGTCGACTGTAAACGCGGCAA  
 GAGCGCATTGTGCTATACTCTTACATATCGACCATGCTCTGCTTGCAGACGCCTTCCCCGGC  
 CTTCTTTTCTTCTTCTGATAAAGGTGGAAAATCCGGCATCACTTCATATTTAGCCCCAATTCCT  
 TTCTATCAGCGGTTACTTAAGTTCTTCTATTAGTAAACGTC

(No se obtuvo el extremo derecho del linker SSNX)

**41. E.4.69 (482 pb)**

ACTCGGAGGACACGATATACCCGTCGTGCGATTGACAAATGGACGGAATGATTTGTTTCCTGTGC  
 GTGTTGAATTCTAATGTATTGCTTGATTGGTTGCTGCCCCCGGTTTCGTGCCCTGTGTGCTCCGT  
 GGCCGAACGACGTGGAATGTGTCATTGACTGCCCCGTGGAGCGTGTCACTCCCTGCCCTCGACCC  
 GCGTGCGGGAGGTGGTTGTGGAGCCAGTGGGCGCCCGTTGCGTTGTGCTGCGTGTGTGTGCTTCT  
 GCTGGGGGCACGTGATGAGGATGTGCGTGTGTGTGCTGGGCCGTCAATGAACGATGTATGTGAGT  
 CTGTGTTTCTGATACATTTTATTTCTATTTTAATTGTGCGATTGGGAAATGGAGCGACTCAACAT  
 TCTTTTGTGTGTGTGCGTTGCTTGCCTTCGGCTTCCCCGCGCCTGAGCCCTCACCTCGCGGTGTGT  
 GCTTGCGGTTGGGAACCGCTGGGAATG

**42. E.4.72 (537 pb)**

GTTTCTGGTGTAGTAGCCACT/CTCTCCCTCTTTTTATTTCCACTCTGTATTTATGTGCACCAGT  
 GTTTTGGGTCGTCTTTGCGTTG/CTTTGTAGTG/CTTCTGCCATTTTTTGTGTGGTGTGTT  
 TTTTTTGTCTCCATTGCGCTCATGAGAGTGGGAAGAAGAGGATAGGGAGAGAACACATGTGAG  
 GTGGTGGAAATCACAGCCCCAAAAGGATATCTTCCGGTAGACCACCGTCGGCGCTTTTTAGAA  
 AGAGAAAGAGAGAGAGAGAGTGTGTGTGTGTGCATGTGATAACTTCAGGGAACCTGGCGGTGG  
 GATAAGAAAATTCATACACATGCATGGCTGCTGTGGACCTTCAGTCTTGTTTCTTATGAATA  
 TCACTGAAATTTGCATTTGGATAAGTGGCGAGGGGATGTGTGTTGGCACCAGTGCCGGTAATGG  
 GGCTGCGGTATGTGTTTTTATGGACCACAGAAGGAAATCTTCACTTAAAGGATGTTATCGGAAA  
 CTAAGGGCCATCGGT

## 43. E.4.80 (413 pb)

AAATAAAGAAAAGAAAAGAGCAGTTTAAATTTGCCTTTGATCCACTCACACATATATGTGTATA  
 AGCAAATGATTGCGCACGCACGATTGTCACCTTTATGGCACAGAGAGAGTCATCAGGAACCCACAA  
 CCACAGAAGGACAGGCGCAGTCCATTGGTTGCATCCTGGCCCCGCATCACTTATCGAAAGAGAAA  
 TAAGTCCGCATAATAAGTTGAACAGAATCACAGGTTGTCAAGCTTACTGCCACGGCAAACACACC  
 TAAGAGCAAAGCGCCCATTAAGGCACTGATAGATGCTTACCCTTCCAAGGCTTGCGCCACTCAC  
 GGAACAAGAAGGACCACAAAAGCTTCAGTGCGGATTTTCGTGTTTCGTTCGTCTGCCAGCATCCCAC  
 GTTCTTCACATTACCCCGAAGA

(No se obtuvo el extremo izquierdo del linker

SSNX)

## 44. E.4.83 (373 pb)

ACCTAAACGCGCGAGAAGCATAATTCAAAGGAAGGAGGAGCAAAAACCTCCAAGGTGGCAGTGGAG  
 CAAAGGCGATTGCCGTTTTTCAGGATGCCGTAGCGCTCCCACGCGCAAGCTGGTAATCCCCCA  
 CAGACACACTCCCCGCCAACCGCAAGGCCAGCAAACAAATAATGATACACCCATCGTCGCATCG  
 GTTGGTGTAAACCCCTCGTCACATCATTTTTGTAAAAATGTAGCTTCCGAGTGAGTGTGTCATC  
 AACTTCCCCCTCCCTCCTCGCCACTGCGGTTGCCTAATGCACAATGCGAGTGTGTGTATGTGT  
 GTGTGATCCCTCCACAAATGGCGTTGAATCTCACACGCCTGTTTTTTT

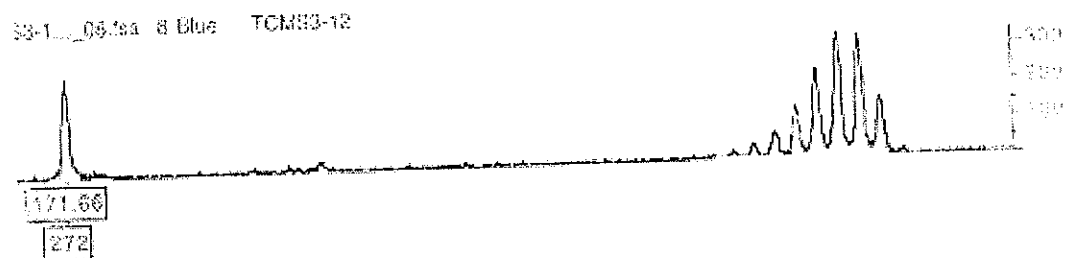
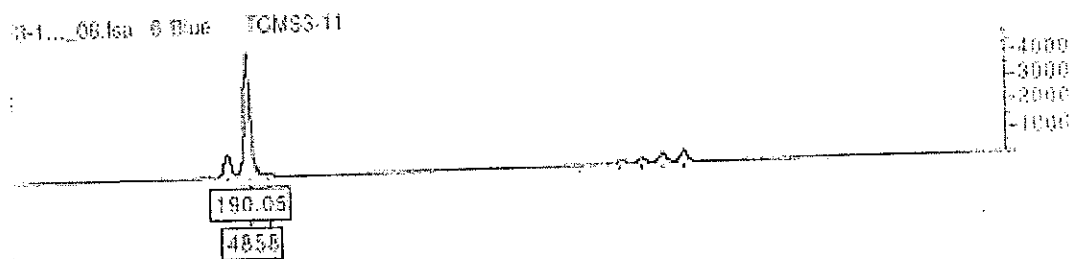
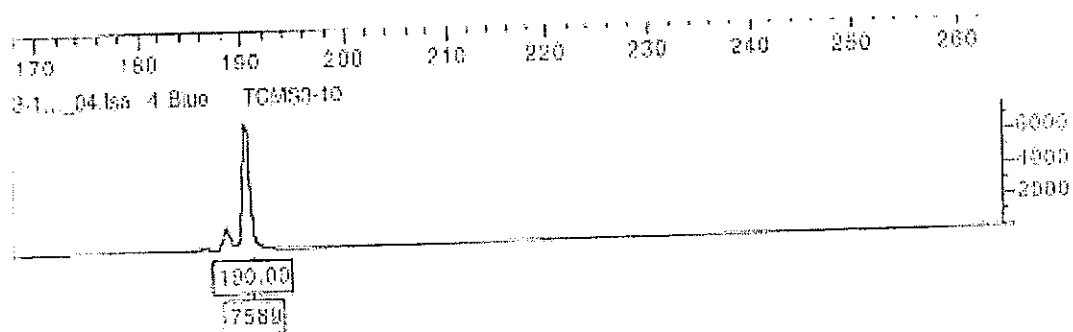
No estaba en SSNX extremo derecho

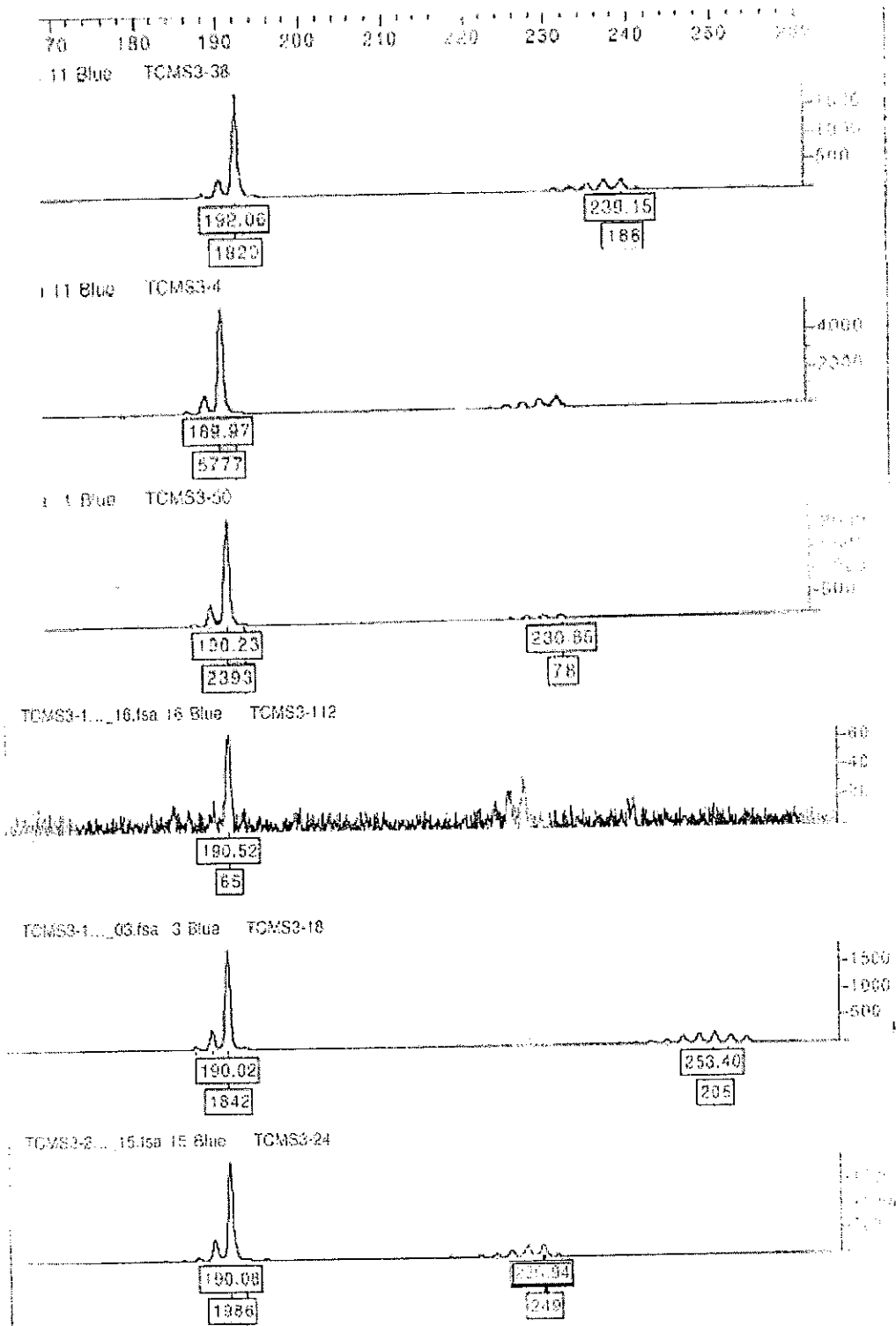
## E. Secuencias correspondientes a genes

Clon correspondiente	Gen <i>T.cruzi</i> correspondiente	Número de acceso en banco de genes (GENBANK)	Valor E	Identidad (%)
E.2.1	Genes para GATasa, CPSasa, DHOase, OMPDCase, OPRTasa, proteína de superficie, ACTasa y DHODasa	AB017765	2e-47	95
E.2.3	Gen muc2 para glicoproteína similar a la mucina	AJ239063	1e-85	94
E.2.20	Gen para la adenilato ciclasa, chaperona (DNAJ), proteína G (Rab1) y gen putativo para subunidad pequeña de proteína G.	AF031927	7e-71	92
E.3.19	Proteína 1 de de una familia de genes dispersos (DGF-1).	M90534	e-106	95
E.3.62	Genes para GATasa, CPSasa, DHOasa, OMPDCasa, OPRTasa, proteína de superficie, ACTasa y DHODasa.	AB017765	9e-72	97
E.3.82	Genes para GATasa, CPSasa, DHOase, OMPDCase-OPRTasa, proteína de superficie, ACTasa y DHODasa.	AB017765	4e-42	95
E.4.14	Genes para GATasa, CPSasa, DHOasa, OMPDCasa, OPRTasa, proteína de superficie, ACTasa y DHODasa.	AB017765	5e-29	90
E.4.35	Gen para antígeno de superficie.	AF510037	3e-52	93
E.4.69	Elemento repetitivo corto interpuesto o "SIRE" por siglas en inglés asociado con retrotransposón.	AF227607	1e-14	82

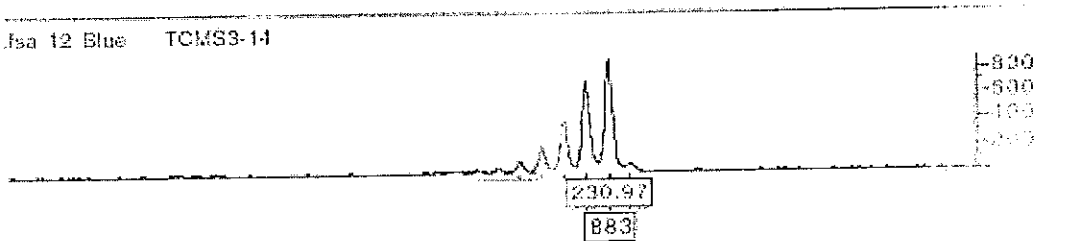
F. Interferogramas correspondientes a aislados escogidos para análisis

1. MS3





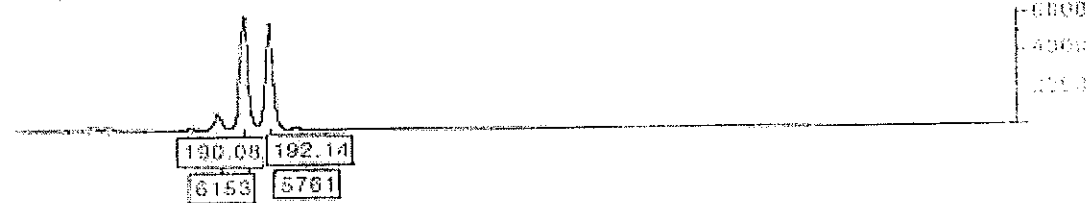
Jsa 12 Blue TCMS3-14



10.fsa 10 Blue TCMS3-29



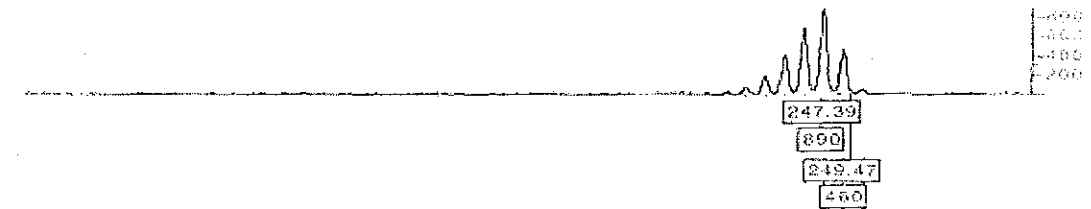
40... 11.fsa 11 Blue TCMS3-CLONE



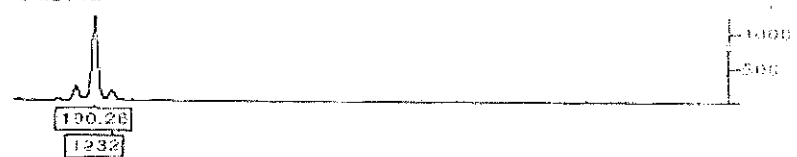
TCMS3-4... 15.fsa 15 Blue TCMS3-40

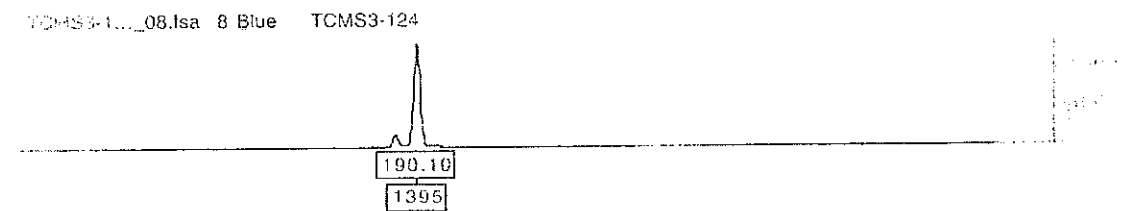
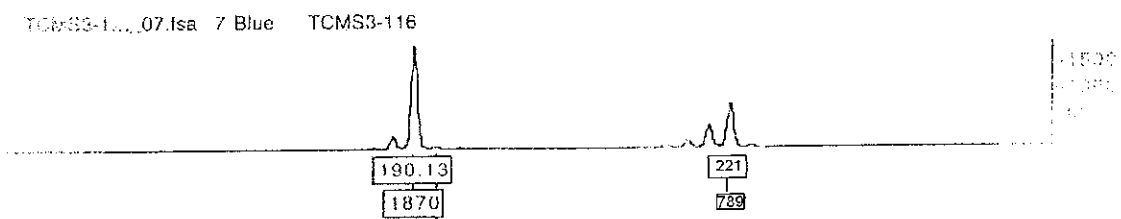
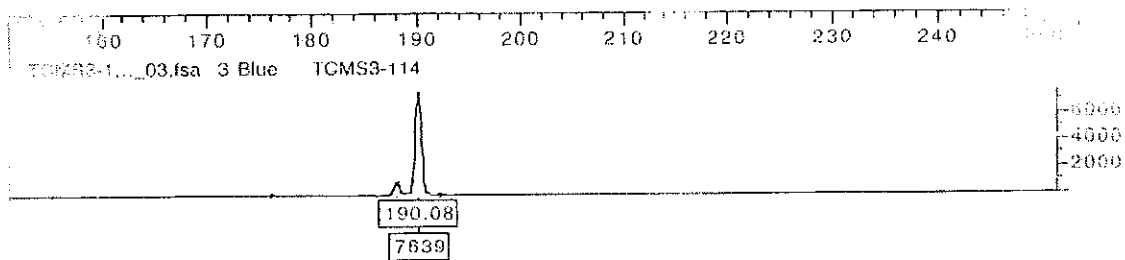


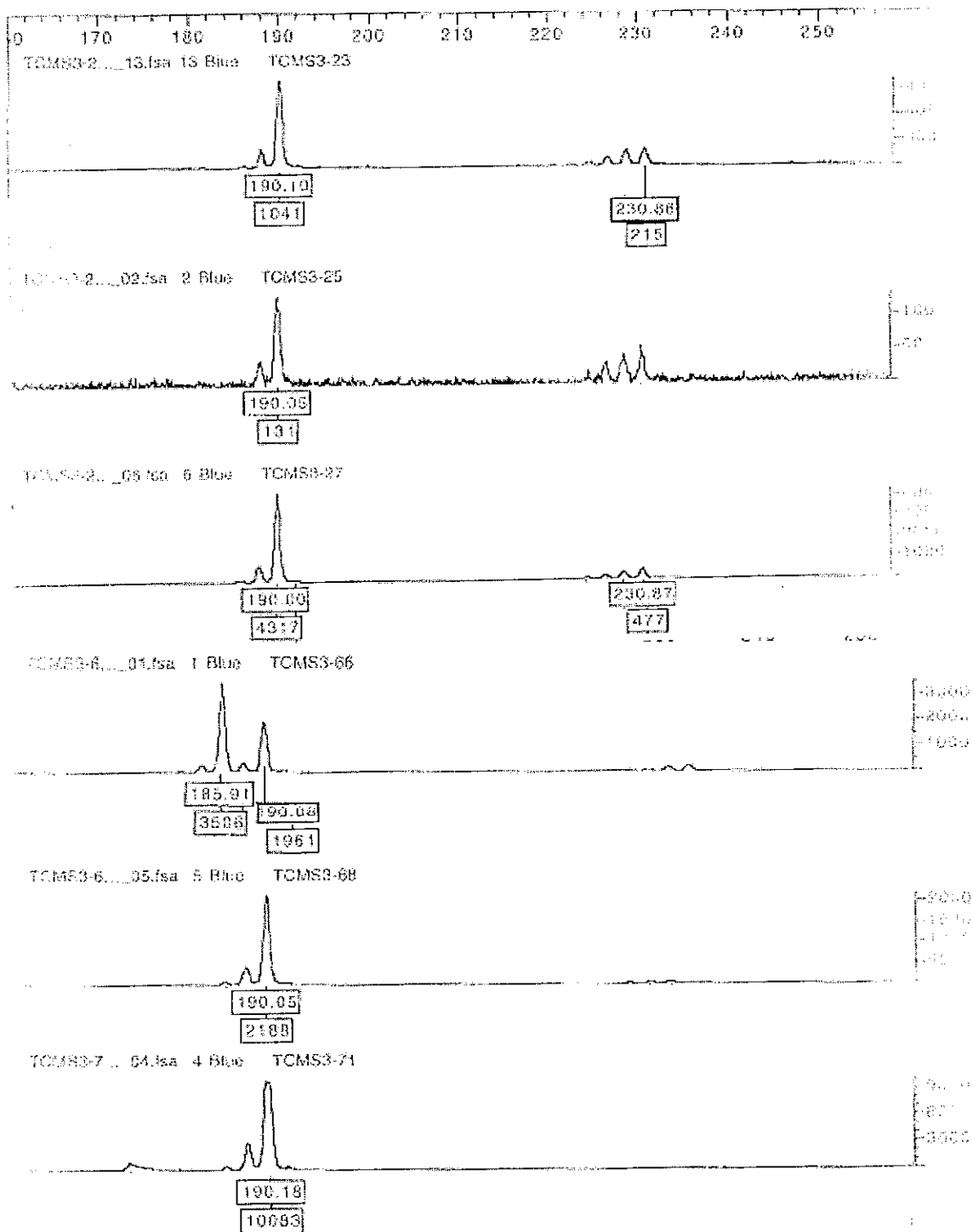
TCMS3-8...\_07.fsa 7 Blue TCMS3-81

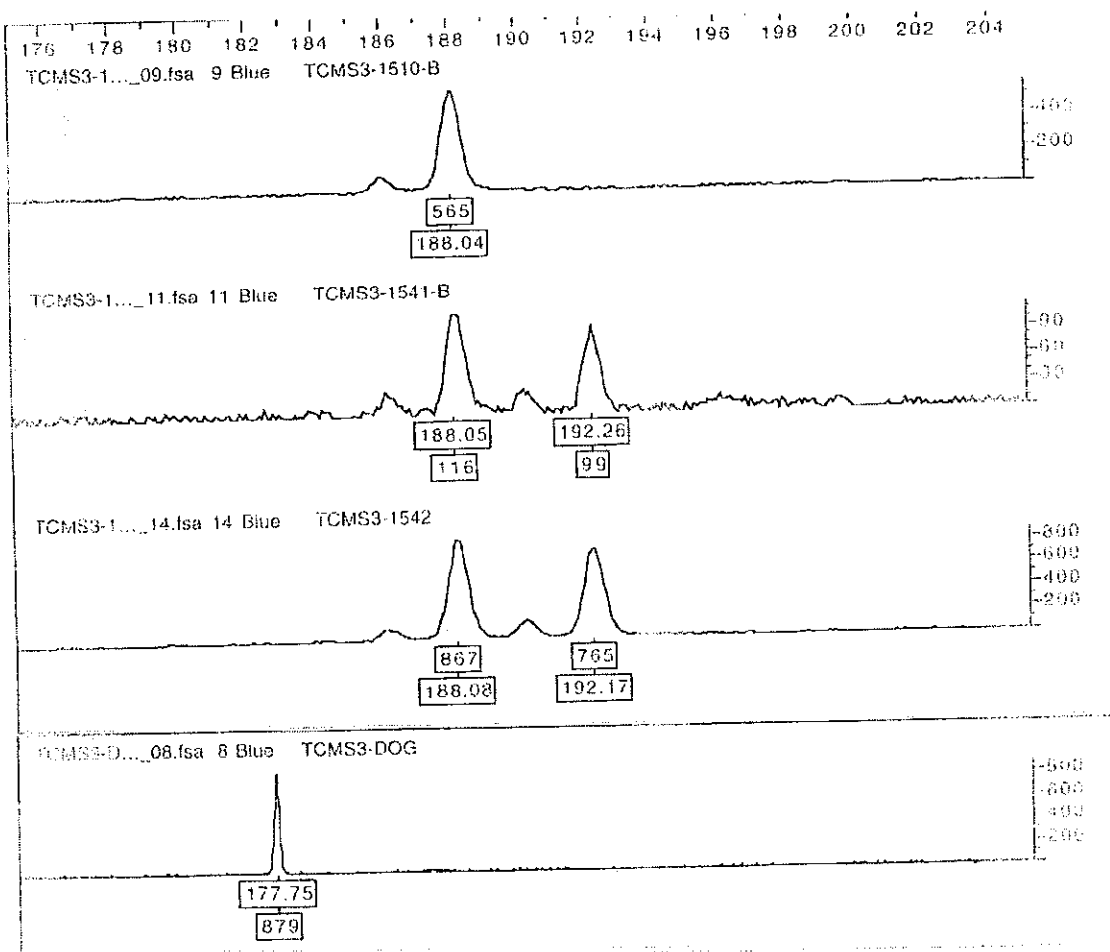


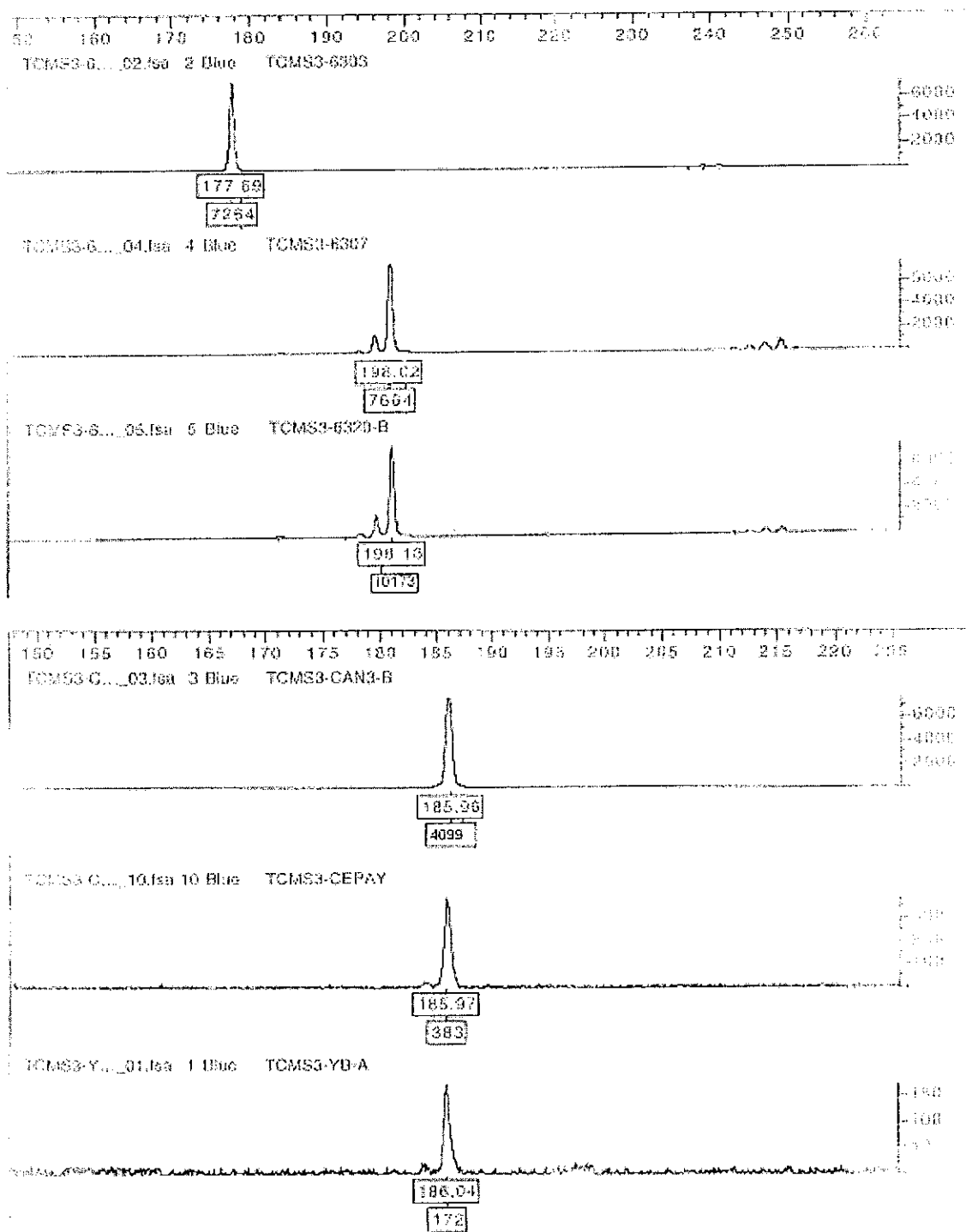
TCMS3-72



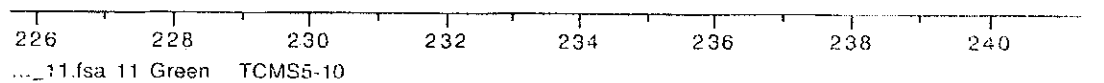


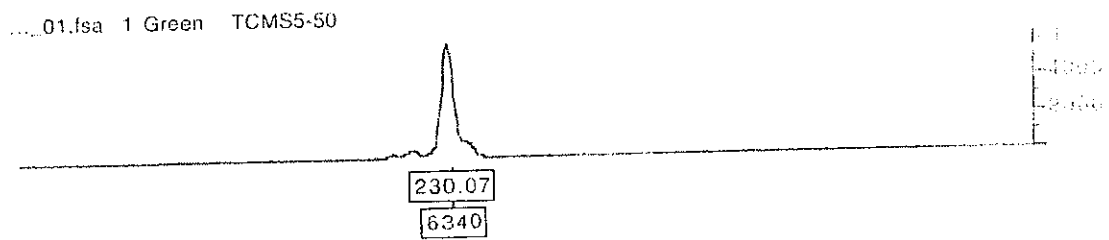
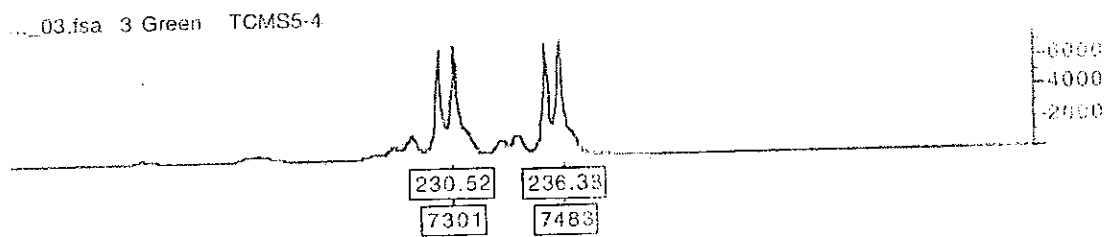
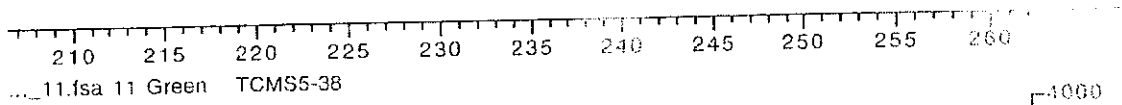


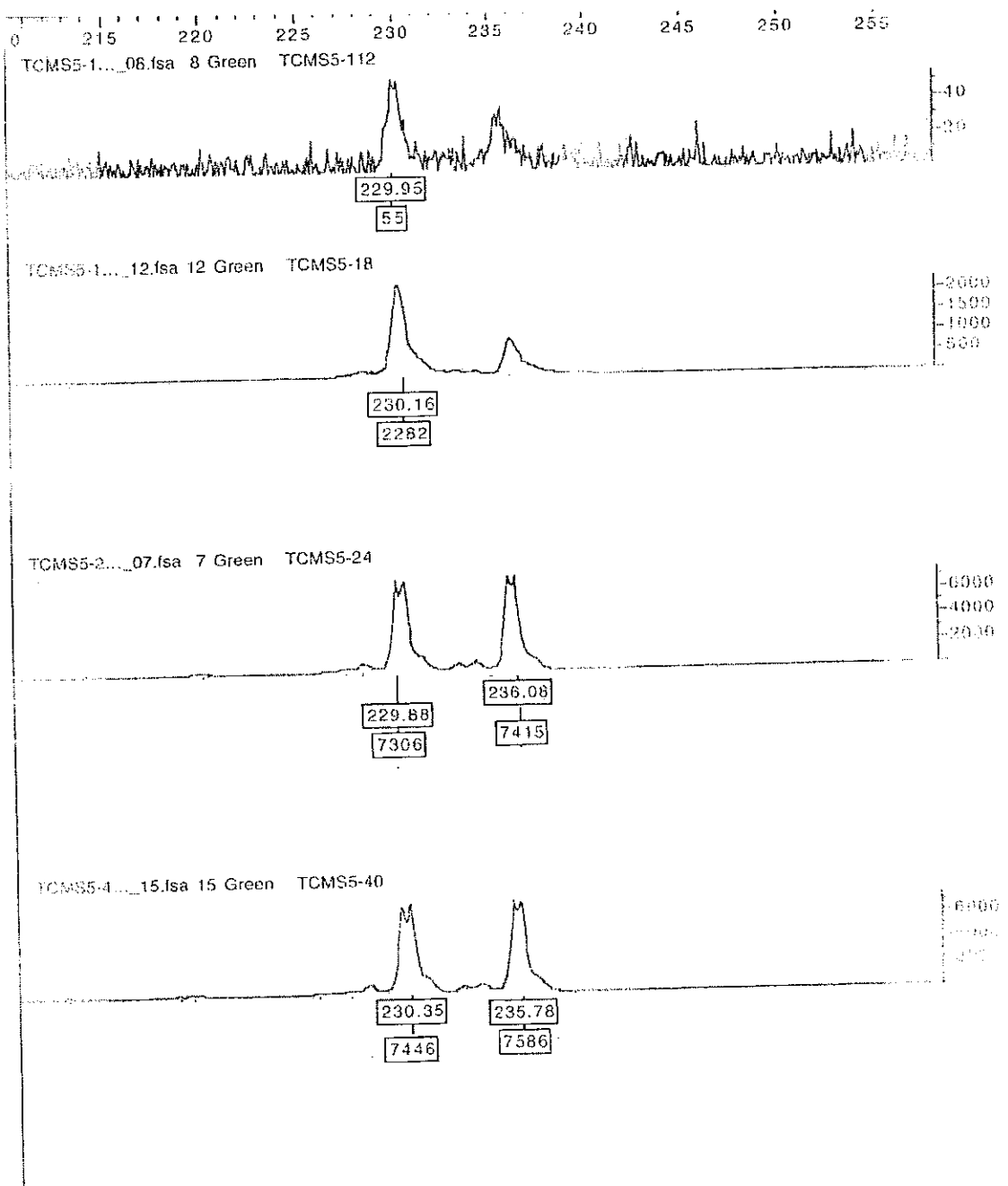


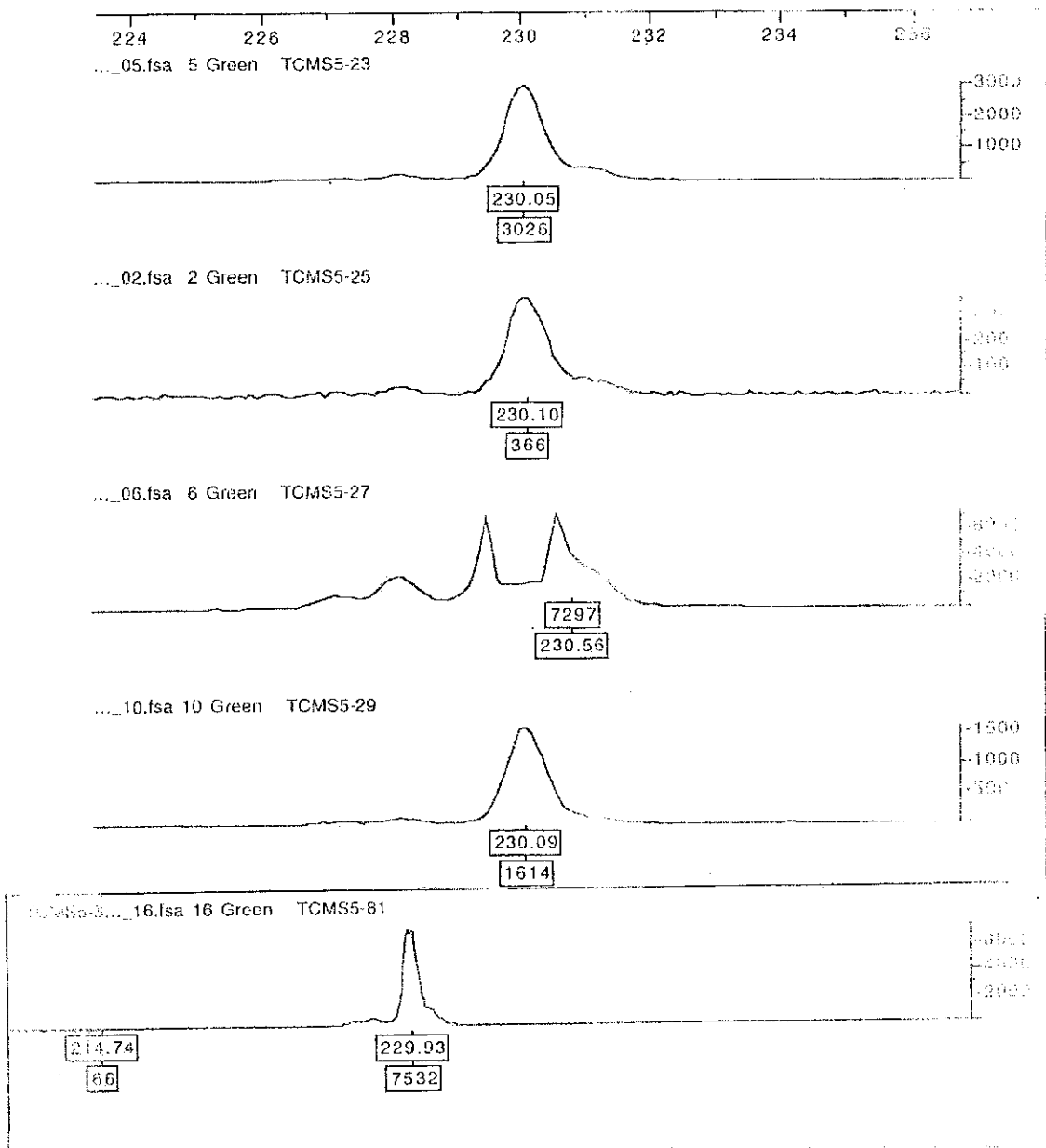


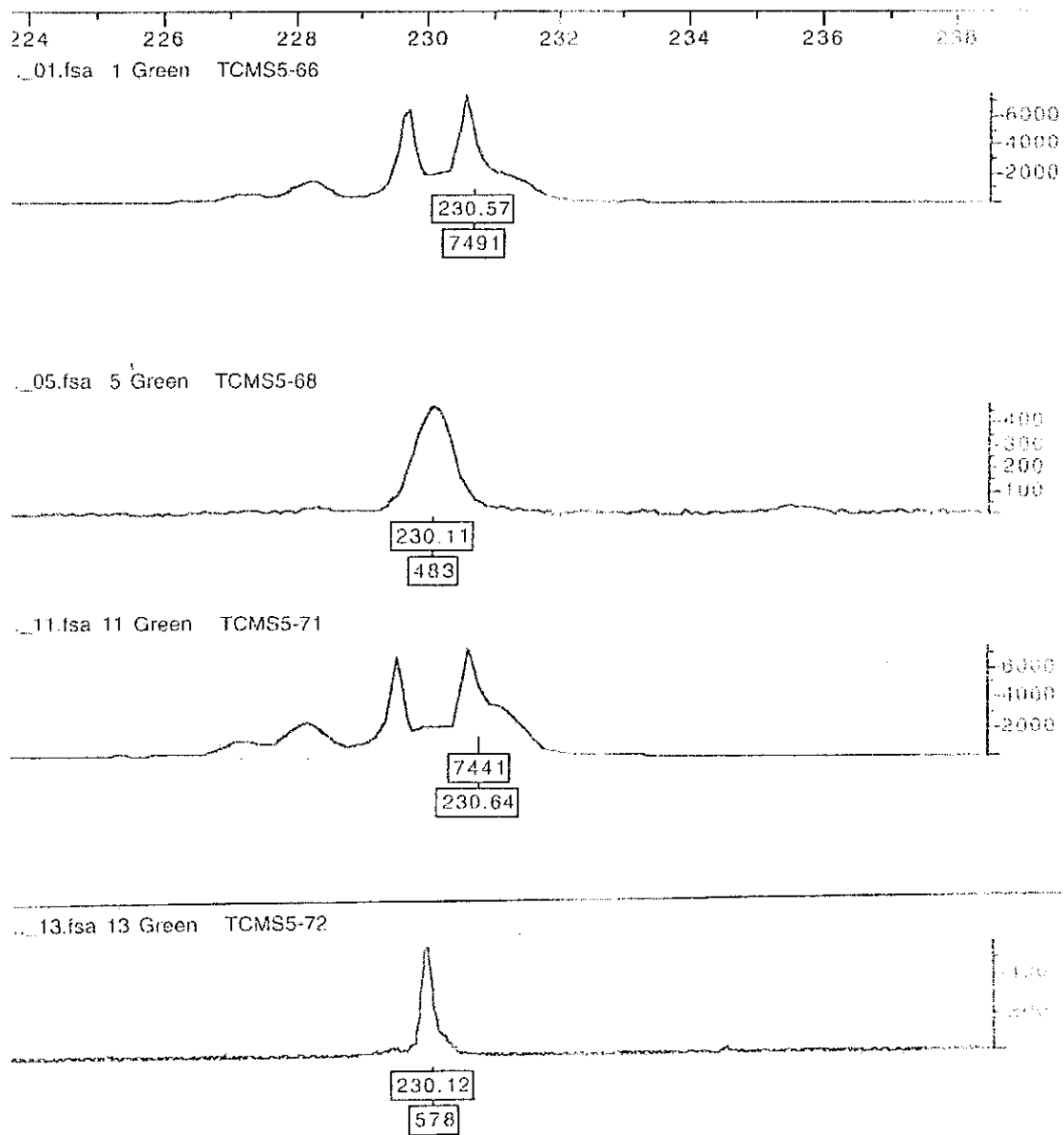
## 2. MS5

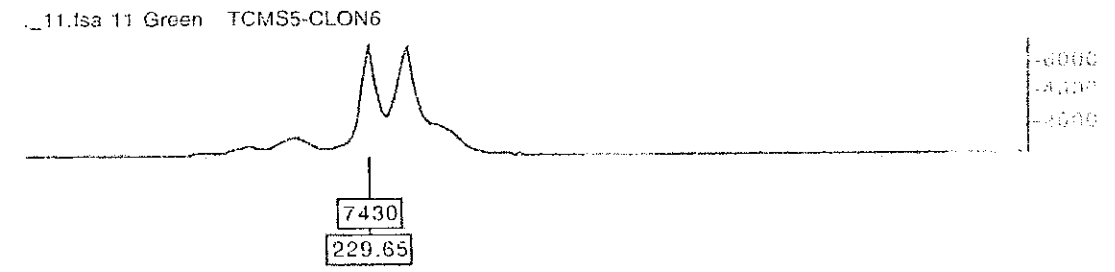
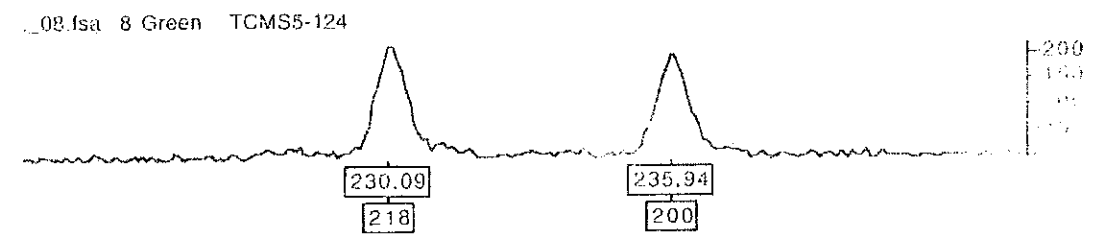
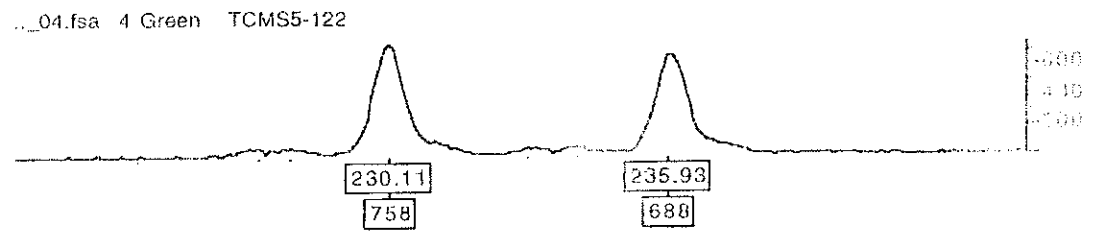
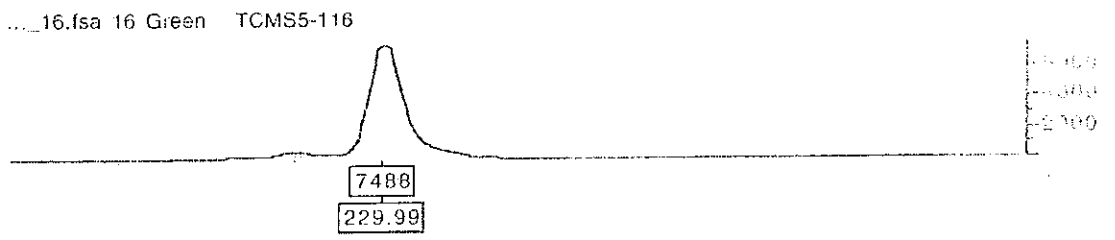
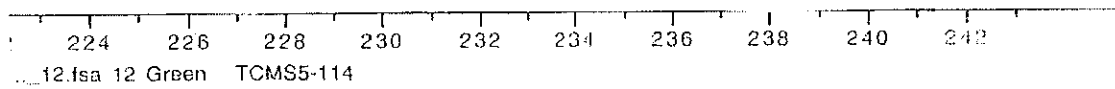


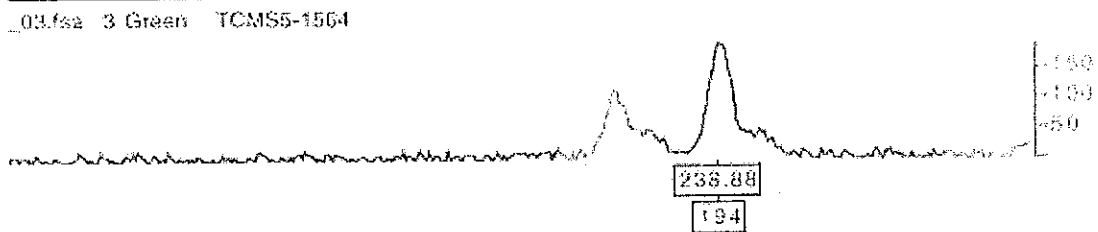
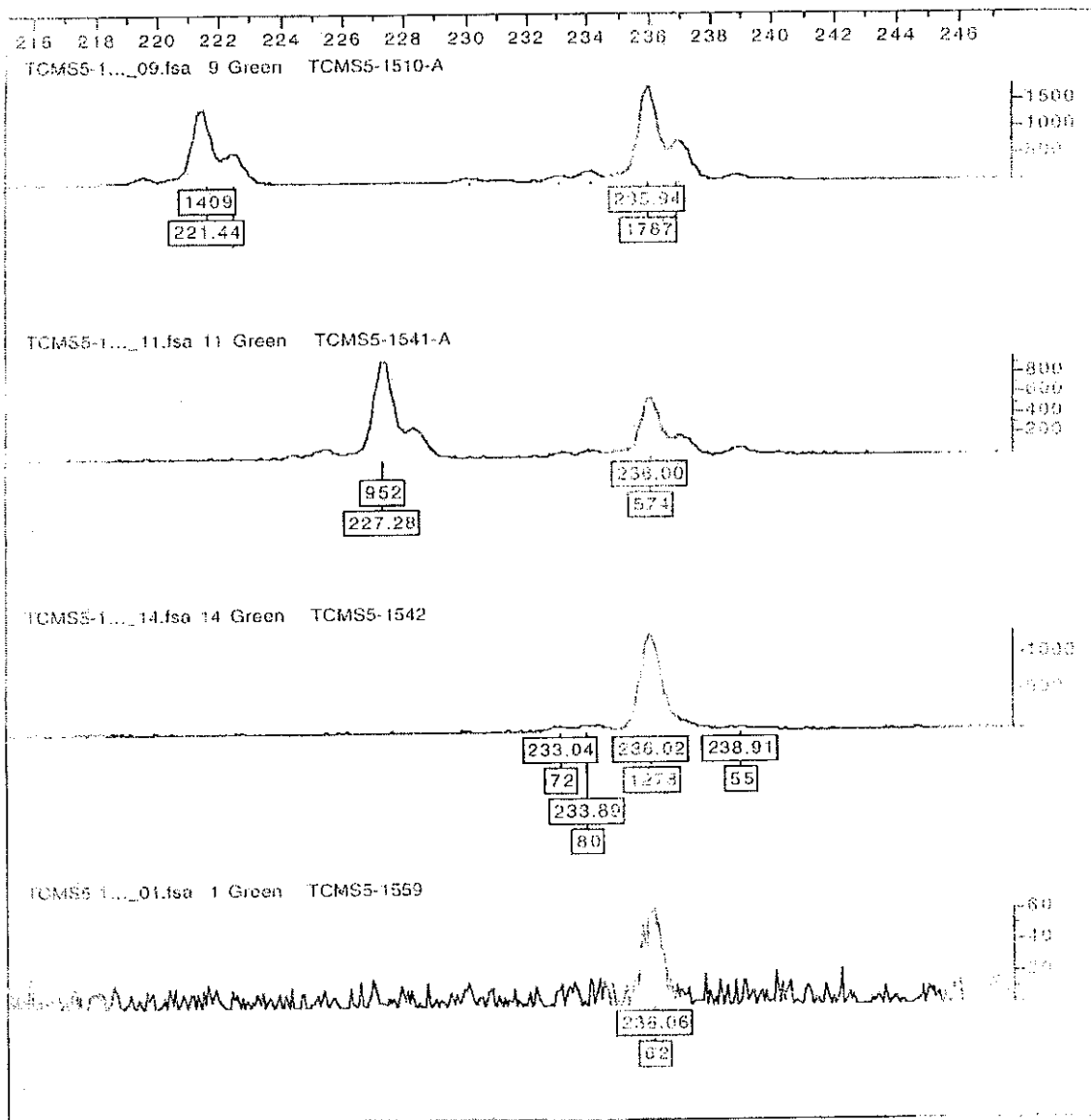


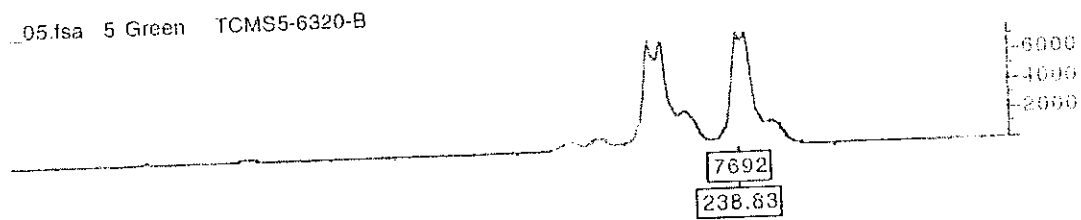
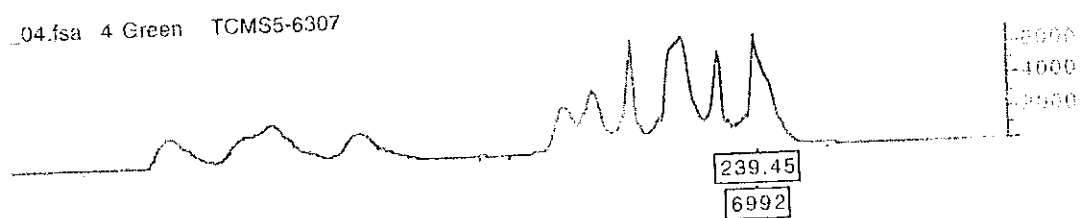
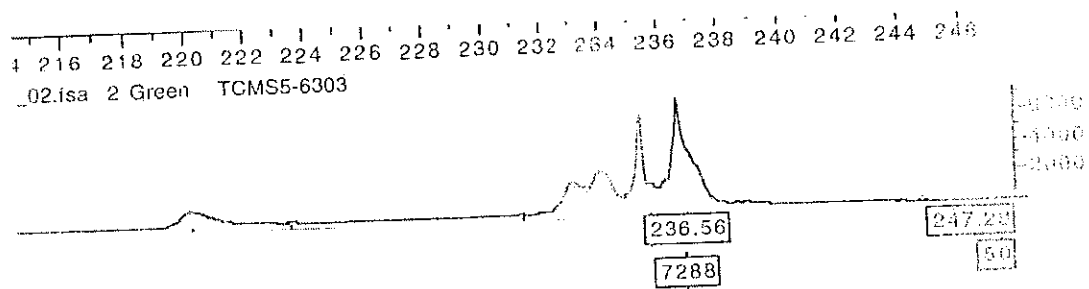


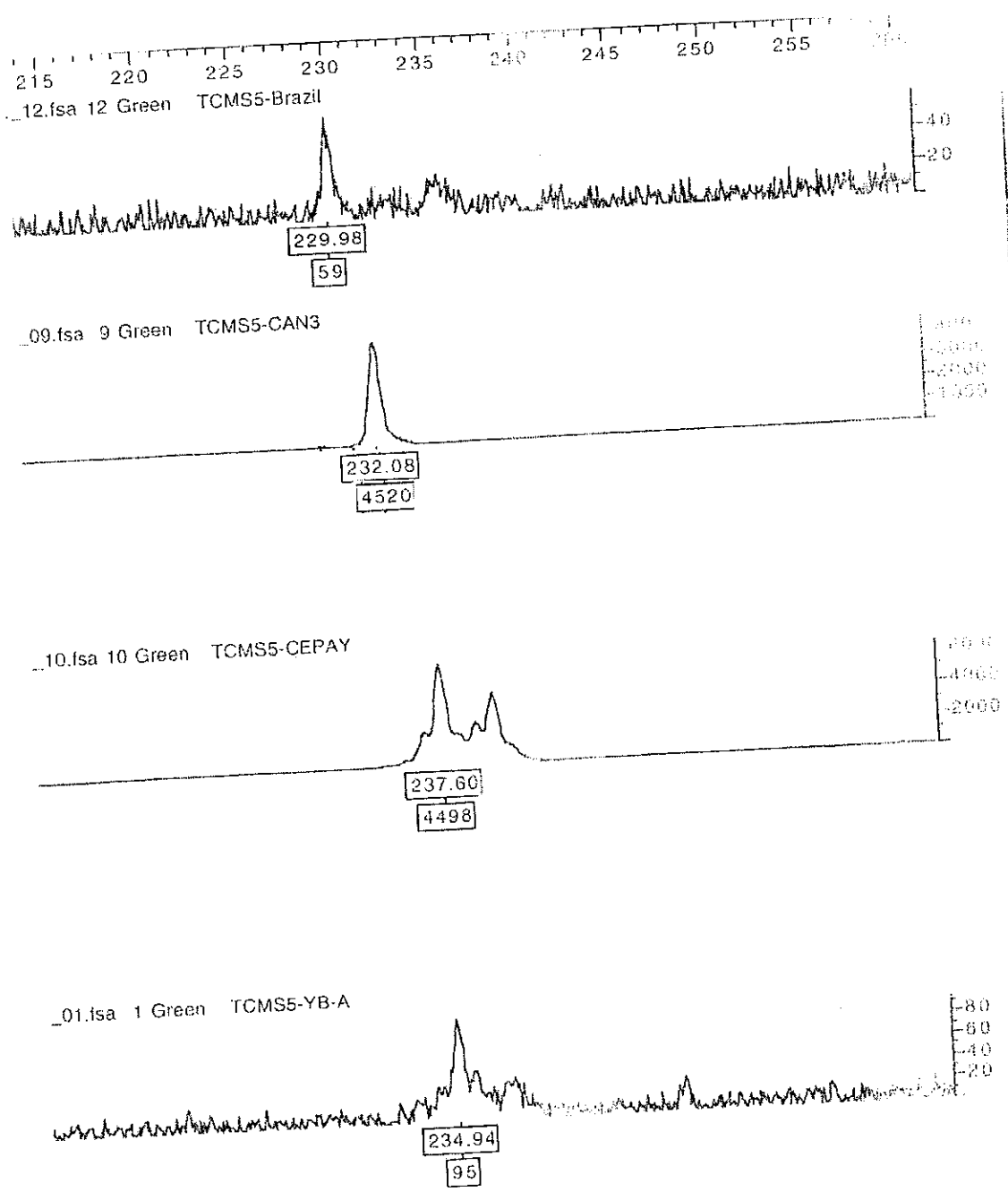




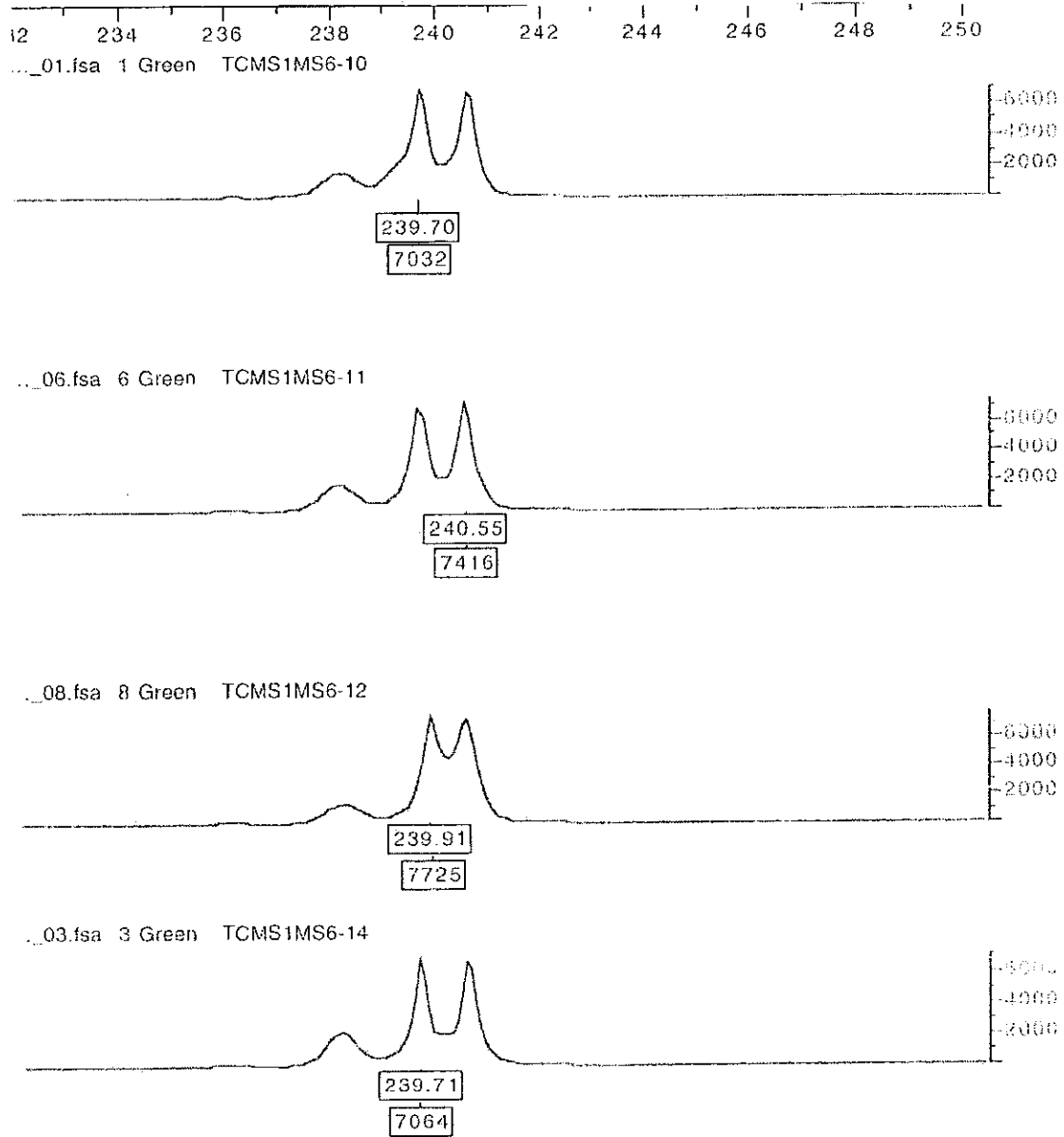


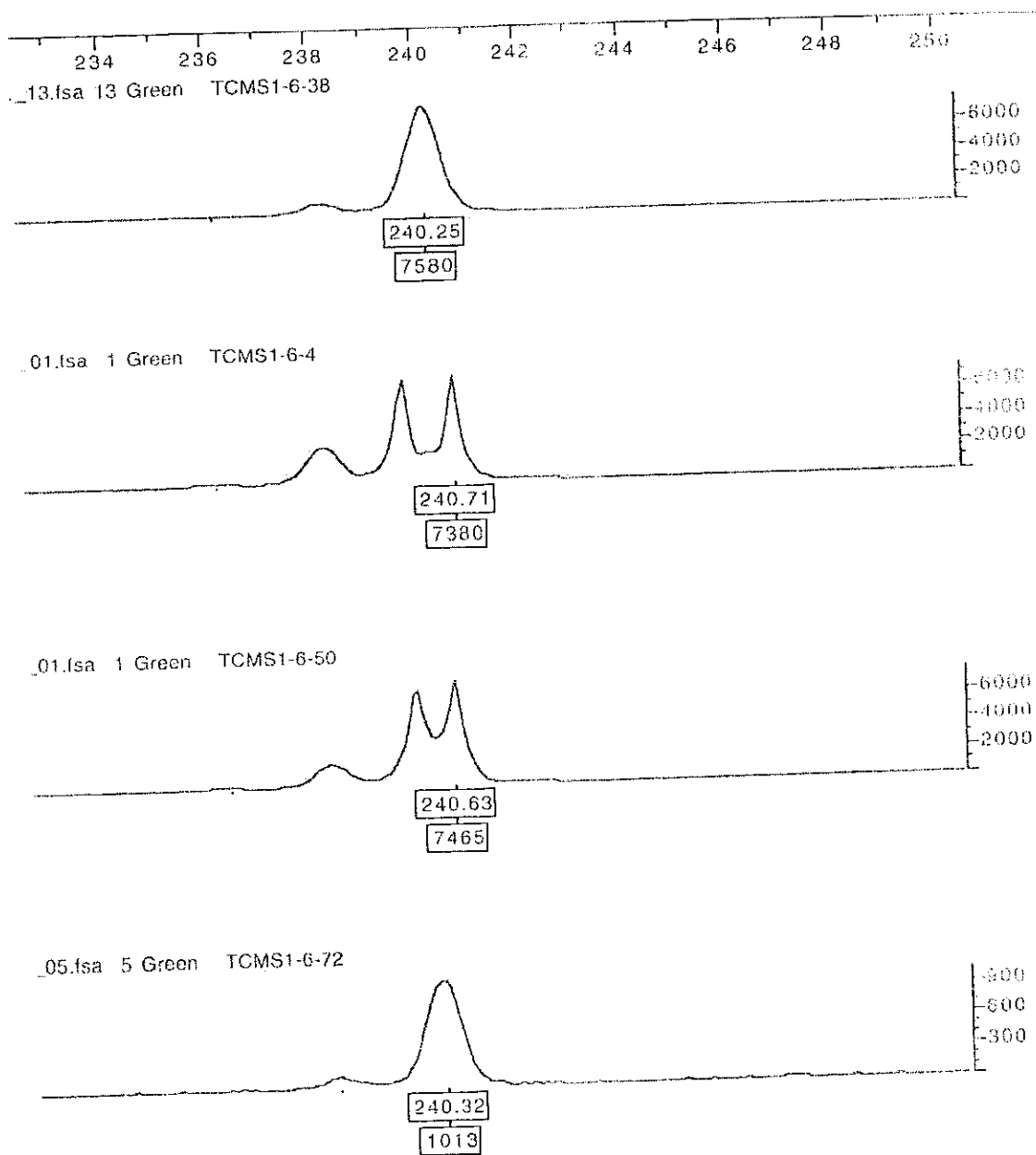


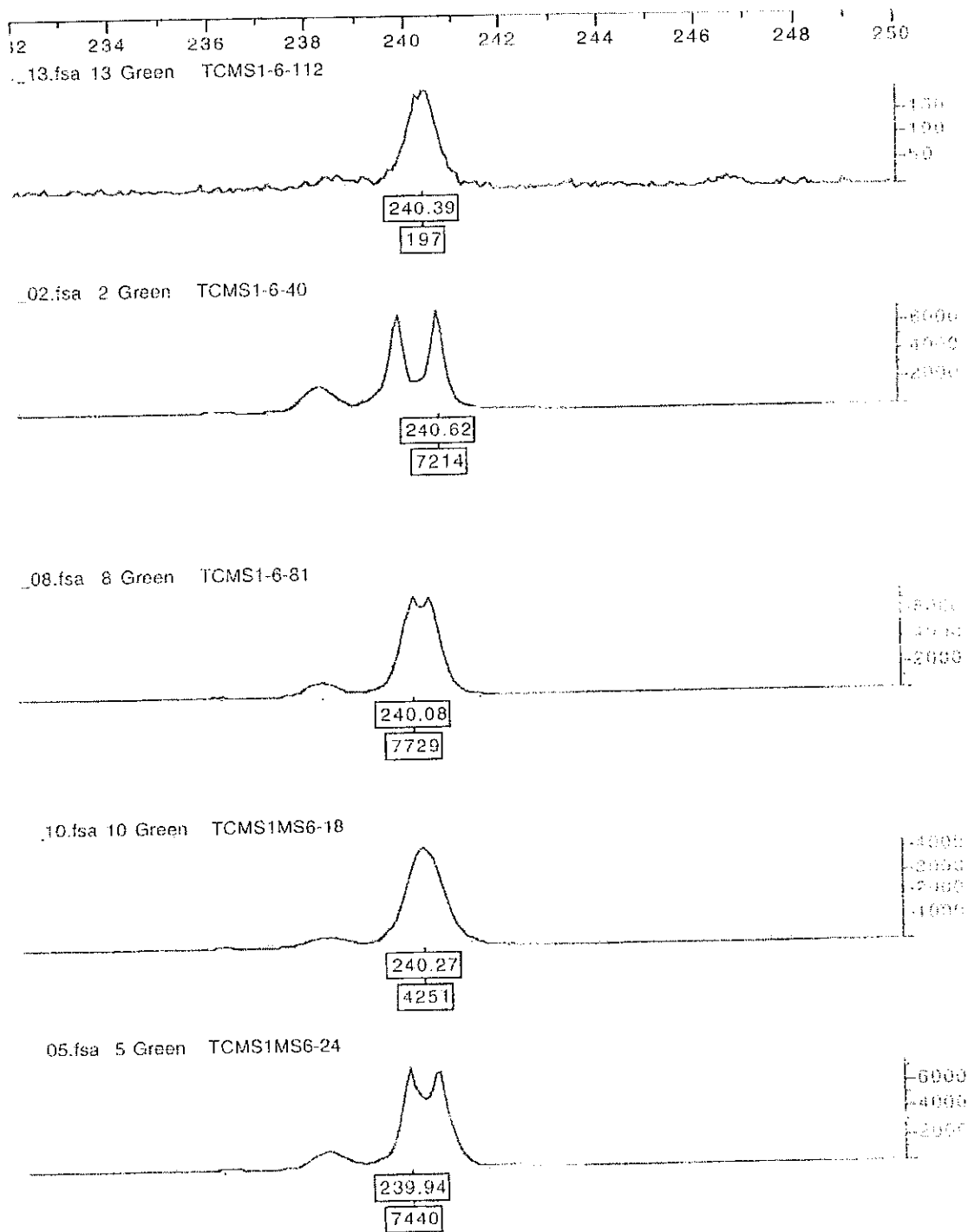


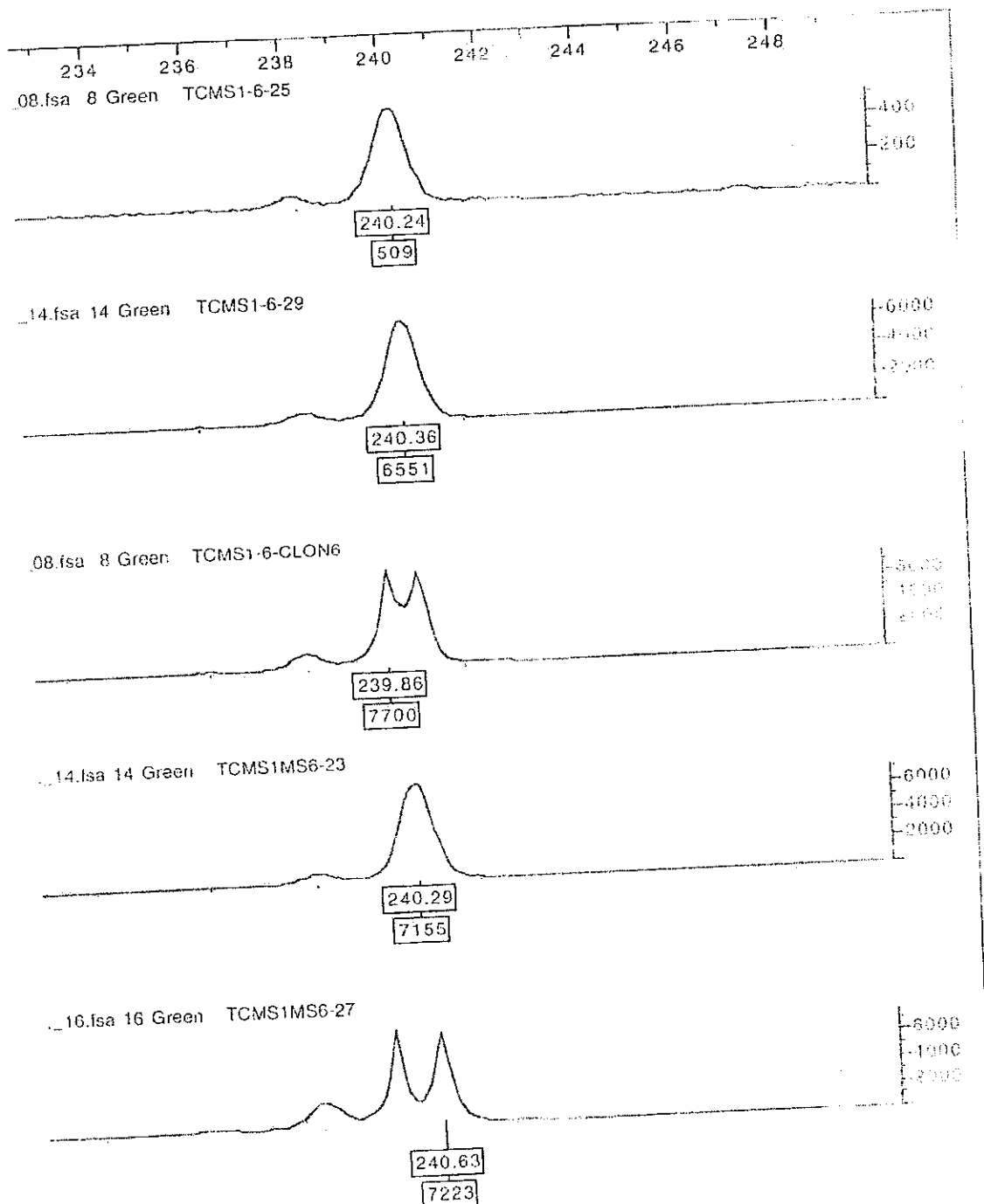


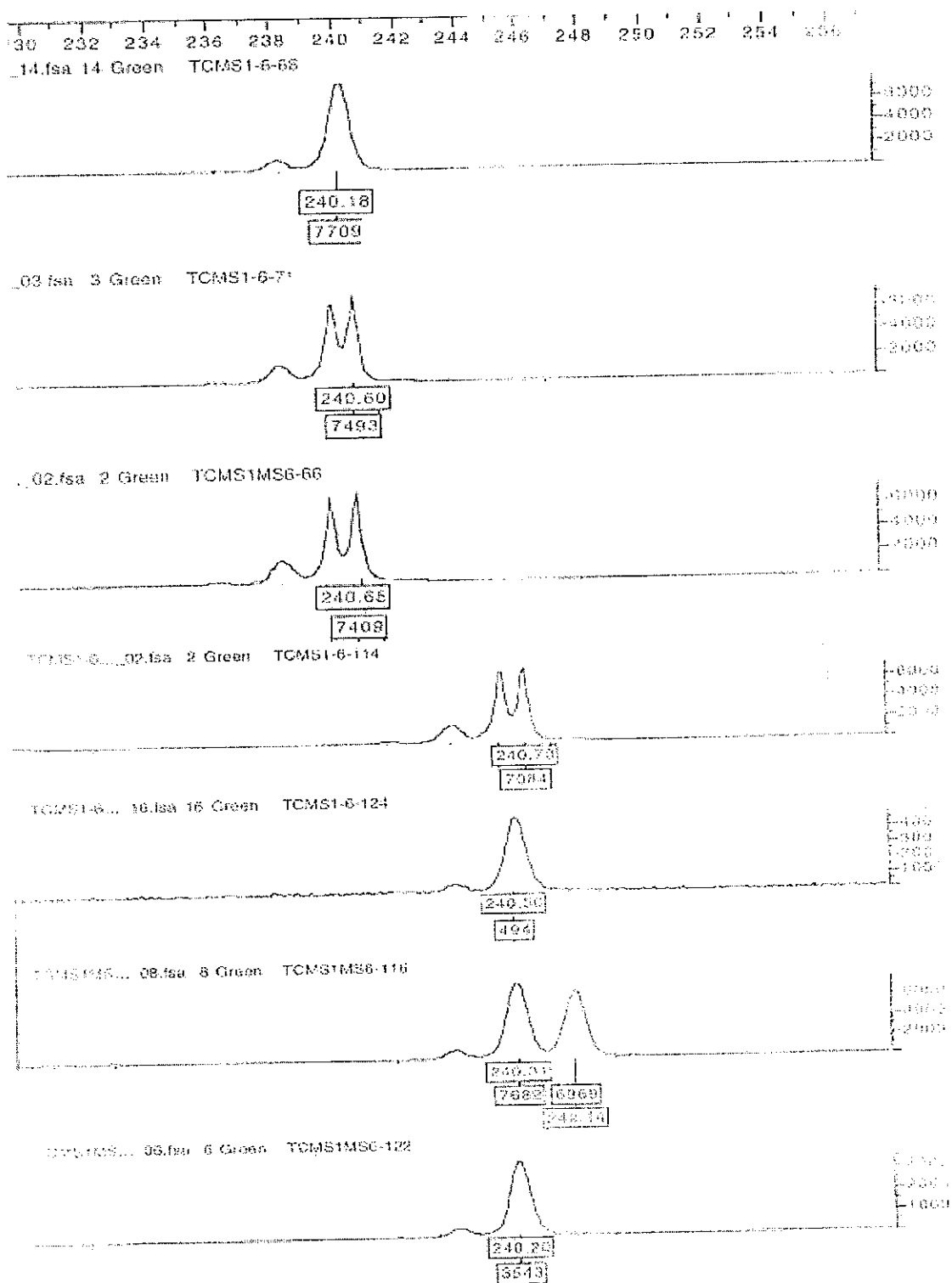
## 3. MS 6

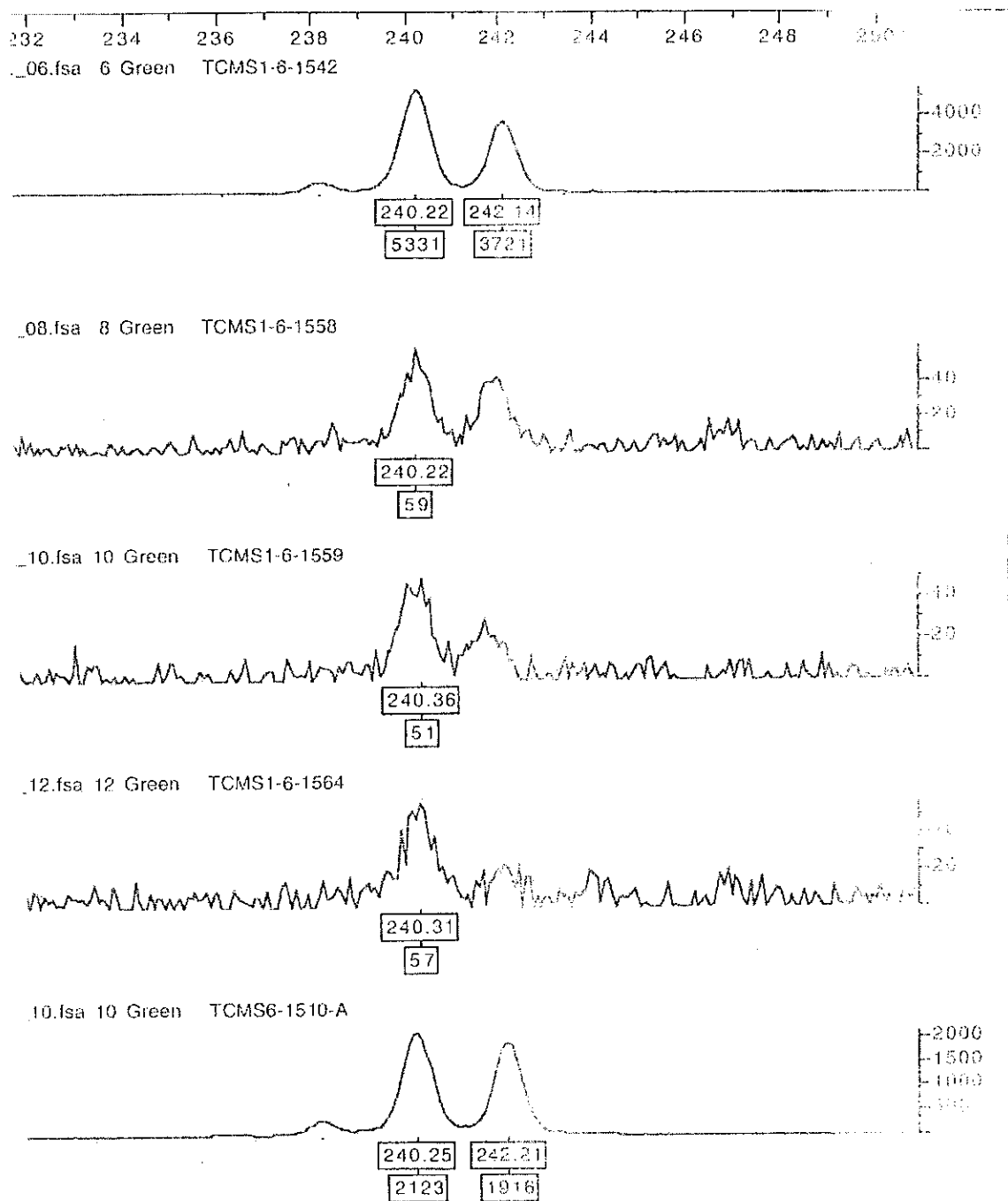


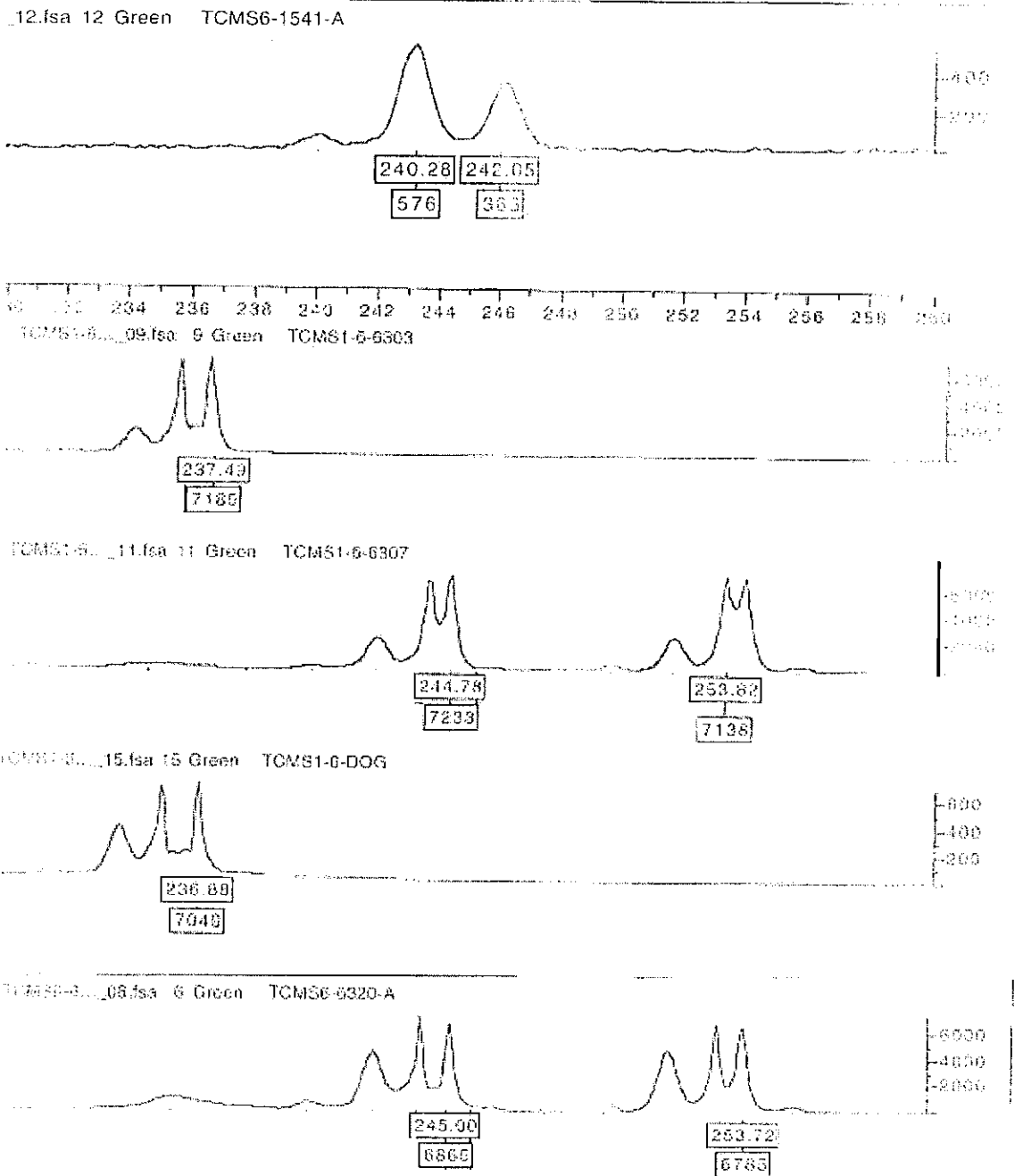


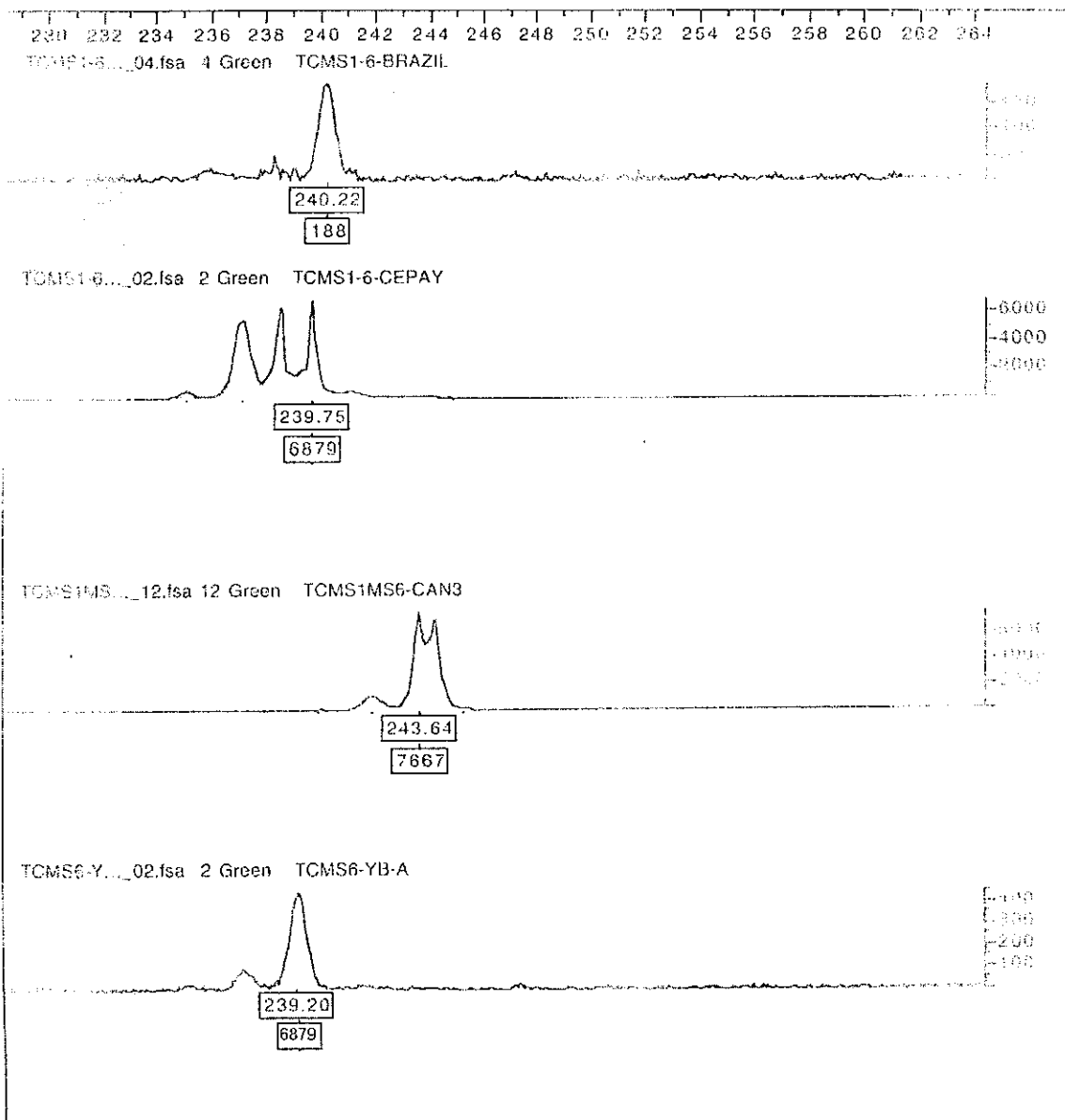












G. Alelos reales registrados para los microsatélites MS3, MS5 y MS6

Alelos amplificados por microsatélite MS 3 Completo

Origen	Muestra	Tamaño fragmento (pb)	Altura pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	10	190	7589	81560	0.09
	11	190	4858	43398	0.11
		233	448	4253	0.11
	12	154	508	5012	0.1
		172	272	2821	0.1
	14	231	883	8979	0.1
	18	190	1842	16455	0.11
		253	205	1911	0.11
	40	190	1556	14985	0.1
		231	210	2072	0.1
	24	190	1986	19928	0.1
		231	249	2589	0.1
	81	247	890	8677	0.1
		249	460	4707	0.1
	112	191	65	726	0.09
	23	190	1041	10099	0.1
		231	215	2170	0.1
	25	190	131	1355	0.1
	27	190	4317	39419	0.11
		231	477	4515	0.11
	29	190	1446	12855	0.11
		247	142	1346	0.11
	4	190	5777	54467	0.11
	38	192	1820	18015	0.1
		239	186	1909	0.1
	50	190	2393	23001	0.1
		231	78	801	0.1
	72	190	1232	11852	0.1
66	186	3506	31336	0.11	
	190	1961	17757	0.11	
68	190	2188	20275	0.11	
71	190	10083	133151	0.08	

Origen	Muestra	Tamaño fragmento (pb)	Altura pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	116	190	1870	16585	0.11
		221	789	7133	0.11
	114	190	7639	69202	0.11
	122	190	3157	27844	0.11
	124	190	1395	12271	0.11
	Clon6	190	3844	36934	0.1
192		3620	35111	0.1	
PANAMÁ	1510	188	2638	21083	0.13
	1541	188	479	3860	0.12
		192	339	2759	0.12
	1542	188	867	7786	0.11
		192	765	7160	0.11
	1558	*NA	--	--	--
	1559	*NA	--	--	--
	1564	*NA	--	--	--
1570	*NA	--	--	--	
1587	*NA	--	--	--	
ECUADOR	6320	198	10173	132700	0.08
	6326	*NA	--	--	--
	6303	178	7264	63133	0.12
	6307	198	7664	78129	0.1
	6312H	*NA	--	--	--
	Dog	178	879	7485	0.12
BRASIL	Can3	186	4099	39610	0.1
	Cepa Y	186	383	4122	0.09
	Brazil	*NA	--	--	--
	YB	186	172	1541	0.11

\* NA: No amplificó

## Alelos amplificados por microsatélite MS 3 Parcial

Origen	Muestra	Tamaño fragmento (pares de bases)	Altura del pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	10	190	7589	81560	0.09
	11	190	4858	43398	0.11
	12	154	508	5012	0.10
		172	272	2821	0.10
	14	Alelo>198	--	--	--
	18	190	1842	16455	0.11
	40	190	1556	14985	0.10
	24	190	1986	19928	0.10
	81	Alelo>198	--	--	--
	112	191	65	726	0.09
	23	190	1041	10099	0.10
	25	190	131	1355	0.10
	27	190	4317	39419	0.11
	29	190	1446	12855	0.11
	4	190	5777	54467	0.11
	38	192	1820	18015	0.10
	50	190	2393	23001	0.10
	72	190	1232	11852	0.10
	66	186	3506	31336	0.11
		190	1961	17757	0.11
	68	190	2188	20275	0.11
	71	190	10083	133151	0.08
	114	190	7639	69202	0.11
	122	190	3157	27844	0.11
	116	190	1870	16585	0.11
	124	190	1395	12271	0.11
Clon6	190	3844	36934	0.10	
	192	3620	35111	0.10	
PANAMÁ	1558	*NA	--	--	--
	1559	*NA	--	--	--
	1564	*NA	--	--	--
	1570	*NA	--	--	--
	1587	*NA	--	--	--
	1510	188	2638	21083	0.13

Origen	Muestra	Tamaño fragmento (pares de bases)	Altura del pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
PANAMÁ	1541	188	479	3860	0.12
		192	339	2759	0.12
	1542	188	867	7786	0.11
		192	765	7160	0.11
ECUADOR	6320	198	10173	132700	0.08
	6326	*NA	--	--	--
	6303	178	7264	63133	0.12
	6307	198	7664	78129	0.10
	6312H	*NA	--	--	--
	Dog	178	879	7485	0.12
BRASIL	Can3	186	4099	39610	0.10
	Cepa Y	186	383	4122	0.09
	Brazil	*NA	0	0	0
	YB-399	186	172	1541	0.11

\* NA: No amplificó

## Alelos amplificados por microsatélite MS 5

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura de pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	4	230	7301	56444	0.13
		236	7483	57385	0.13
	10	230	7188	56926	0.13
		236	7331	55182	0.13
	11	230	7396	65147	0.11
	12	230	3676	41853	0.09
		236	3375	39146	0.09
	14	231	7373	72073	0.1
	18	230	2282	30231	0.08
	23	230	3026	31384	0.1
	24	230	7306	89208	0.08
		236	7415	87122	0.09
	25	230	366	4314	0.08
	27	231	7297	64594	0.11
	29	230	1614	15805	0.1
	38	230	4009	42943	0.09
	40	230	7446	95919	0.08
		236	7586	93123	0.08
	50	230	6340	65132	0.1
	66	231	7491	57481	0.13
	68	230	483	4897	0.1
	71	231	7441	69238	0.11
	72	230	578	7071	0.08
	81	230	7532	93288	0.08
	112	230	55	738	0.07
	114	230	7623	88186	0.09
236		7561	85077	0.09	
116	230	7488	84616	0.09	
122	230	758	7804	0.1	
	236	688	7258	0.09	
124	230	218	2338	0.09	
	236	200	2073	0.1	
Clon 6	230	7430	96528	0.08	
PANAMÁ	1510	221	1409	14178	0.1
		236	1787	17705	0.1
	1541	227	952	11310	0.08
		236	574	7136	0.08
	1542	236	1278	13709	0.09

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura de pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
PANAMÁ	1559	236	62	633	0.1
	1564	239	194	2005	0.1
	1558	*NA	--	--	--
	1570	*NA	--	--	--
	1587	*NA	--	--	--
ECUADOR	6326	*NA	--	--	--
	6303 H	237	7288	67971	0.11
	6307	239	6992	65183	0.11
	6312H	237	54	762	0.07
	6320	239	7692	86231	0.09
	DOG	234	7564	81835	0.09
		237	7126	80467	0.09
BRASIL	Brazil	230	59	523	0.11
	Can3	232	4520	44683	0.1
	Cepa Y	238	4498	62899	0.07
	YB	235	95	1611	0.06

\* NA: No amplificó

## Alelos amplificados por microsatélite MS 6

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	4	241	7380	38616	0.19
	10	240	7032	46199	0.15
	11	241	7416	42676	0.17
	12	240	7725	90880	0.09
	14	240	7064	36998	0.19
	18	240	4251	48464	0.09
	23	240	7155	72372	0.1
	24	240	7440	86163	0.09
	25	240	509	5142	0.1
	27	241	7223	44595	0.16
	29	240	6551	62838	0.1
	38	240	7580	72237	0.1
	40	241	7214	39483	0.18
	50	241	7465	80867	0.09
	66	241	7409	42678	0.17
	68	240	7709	77185	0.1
	71	241	7493	80669	0.09
	72	240	1013	10212	0.1
	81	240	7729	83641	0.09
	112	240	197	2222	0.09
	114	241	7084	43400	0.16
	116	240	7682	78125	0.1
		242	6969	68301	0.1
122	240	3543	34652	0.1	
124	240	494	5338	0.09	
Clon 6	240	7700	85748	0.09	
PANAMÁ	1510	240	2123	19898	0.11
		242	1916	18232	0.11
	1541	240	576	5576	0.1
		242	363	3577	0.1
	1542	240	5331	50124	0.11
		242	3721	35299	0.11
	1558	240	59	584	0.1
	1559	240	51	553	0.09
	1564	240	57	721	0.08
	1570	NA	--	--	--
1587	NA	--	--	--	
ECUADOR	6303 H	237	7189	40497	0.18
	6307	245	7233	84180	0.09

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura de pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
ECUADOR	6320	245	6865	36844	0.19
		254	6785	35477	0.19
	DOG	237	7049	39332	0.18
	6326	NA	--	--	--
	6312H	NA	--	--	--
BRASIL	Brazil	240	188	1883	0.1
	Can 3	244	7667	85895	0.09
	YB	239	454	4015	0.11
	Cepa-Y	240	6879	38374	0.18

\* NA: No amplificó

**Alelos amplificados por microsatélite MS 6  
(Corrigiendo el tamaño del alelo de 241pb)**

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
GUATEMALA	4	240	7380	38616	0.19
	10	240	7032	46199	0.15
	11	240	7416	42676	0.17
	12	240	7725	90880	0.09
	14	240	7064	36998	0.19
	18	240	4251	48464	0.09
	23	240	7155	72372	0.1
	24	240	7440	86163	0.09
	25	240	509	5142	0.1
	27	240	7223	44595	0.16
	29	240	6551	62838	0.1
	38	240	7580	72237	0.1
	40	240	7214	39483	0.18
	50	240	7465	80867	0.09
	66	240	7409	42678	0.17
	68	240	7709	77185	0.1
	71	240	7493	80669	0.09
	72	240	1013	10212	0.1
	81	240	7729	83641	0.09
	112	240	197	2222	0.09
114	240	7084	43400	0.16	
	240	7682	78125	0.1	
116	242	6969	68301	0.1	
	240	3543	34652	0.1	
122	240	494	5338	0.09	
124	240	7700	85748	0.09	
PANAMÁ	1510	240	2123	19898	0.11
		242	1916	18232	0.11
	1541	240	576	5576	0.1
		242	363	3577	0.1
	1542	240	5331	50124	0.11
		242	3721	35299	0.11
	1558	240	59	584	0.1
	1559	240	51	553	0.09
	1564	240	57	721	0.08
	1570	NA	--	--	--
1587	NA	--	--	--	

Origen	Muestra	Tamaño (pb)	Altura de pico (UF)	Área pico	Razón altura/área
ECUADOR	6303 H	237	7189	40497	0.18
	6307	245	7233	84180	0.09
	6320	245	6865	36844	0.19
		254	6785	35477	0.19
	DOG	237	7049	39332	0.18
	6326	NA	--	--	--
	6312H	NA	--	--	--
BRASIL	Brazil	240	188	1883	0.1
	Can 3	244	7667	85895	0.09
	YB	239	454	4015	0.11
	Cepa-Y	240	6879	38374	0.18

\* NA: No amplificó

## H. Matriz de índice de similitud de Nei-Li

## 1. MS3 Completo

	4	10	11	12	14	18	23	24	25	27	29	38	40	50	66	68
4	1.00															
10	0.75	1.00														
11	0.75	0.50	1.00													
12	0.44	0.67	0.22	1.00												
14	0.00	0.33	0.00	0.29	1.00											
18	0.50	0.75	0.50	0.44	0.33	1.00										
23	0.50	0.75	0.50	0.44	0.67	0.75	1.00									
24	0.67	0.89	0.44	0.60	0.57	0.67	0.89	1.00								
25	0.57	0.86	0.57	0.50	0.40	0.86	0.86	0.75	1.00							
27	0.57	0.29	0.57	0.00	0.40	0.29	0.57	0.50	0.33	1.00						
29	0.50	0.75	0.50	0.44	0.33	0.75	0.75	0.67	0.86	0.29	1.00					
38	0.25	0.50	0.25	0.44	0.33	0.50	0.50	0.44	0.57	0.00	0.50	1.00				
40	0.89	0.67	0.67	0.40	0.29	0.44	0.67	0.80	0.50	0.75	0.44	0.22	1.00			
50	0.75	0.50	0.75	0.22	0.33	0.50	0.75	0.67	0.57	0.86	0.50	0.25	0.89	1.00		
66	0.50	0.25	0.50	0.00	0.33	0.25	0.50	0.44	0.29	0.86	0.25	0.00	0.67	0.75	1.00	
68	0.57	0.86	0.57	0.50	0.40	0.86	0.86	0.75	1.00	0.33	0.86	0.57	0.50	0.57	0.29	1.00
71	0.57	0.29	0.57	0.00	0.40	0.29	0.57	0.50	0.33	1.00	0.29	0.00	0.75	0.86	0.86	0.33
72	0.57	0.86	0.57	0.50	0.40	0.86	0.86	0.75	1.00	0.33	0.86	0.57	0.50	0.57	0.29	1.00
81	0.25	0.50	0.25	0.44	0.33	0.50	0.50	0.44	0.57	0.00	0.75	0.50	0.22	0.25	0.00	0.57
112	0.29	0.57	0.29	0.50	0.40	0.57	0.57	0.50	0.67	0.00	0.57	0.57	0.25	0.29	0.00	0.67
114	1.00	0.75	0.75	0.44	0.00	0.50	0.50	0.67	0.57	0.57	0.50	0.25	0.89	0.75	0.50	0.57
116	0.44	0.67	0.44	0.40	0.29	0.67	0.67	0.60	0.75	0.25	0.67	0.44	0.40	0.44	0.22	0.75
122	0.75	1.00	0.50	0.67	0.33	0.75	0.75	0.89	0.86	0.29	0.75	0.50	0.67	0.50	0.25	0.86
124	0.75	1.00	0.50	0.67	0.33	0.75	0.75	0.89	0.86	0.29	0.75	0.50	0.67	0.50	0.25	0.86
Clon 6	0.50	0.75	0.50	0.44	0.33	0.75	0.75	0.67	0.86	0.29	0.75	0.75	0.44	0.50	0.25	0.86
1510	0.22	0.44	0.00	0.40	0.29	0.22	0.22	0.40	0.25	0.00	0.22	0.22	0.20	0.00	0.00	0.25
1541	0.20	0.40	0.00	0.36	0.25	0.20	0.20	0.36	0.22	0.00	0.20	0.40	0.18	0.00	0.00	0.22
1542	0.22	0.44	0.00	0.40	0.29	0.22	0.22	0.40	0.25	0.00	0.22	0.44	0.20	0.00	0.00	0.25
1558	0.00	0.40	0.00	0.33	0.67	0.40	0.40	0.33	0.50	0.00	0.40	0.40	0.00	0.00	0.00	0.50
1559	0.33	0.67	0.00	0.57	0.50	0.33	0.33	0.57	0.40	0.00	0.33	0.33	0.29	0.00	0.00	0.40
1564	0.00	0.33	0.00	0.29	0.50	0.33	0.33	0.29	0.40	0.00	0.33	0.67	0.00	0.00	0.00	0.40
6320	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
6303	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6307	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00
6312H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dog	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00
Cepa Y	0.00	0.29	0.00	0.25	0.40	0.29	0.29	0.25	0.33	0.00	0.29	0.29	0.00	0.00	0.29	0.33
Brazil	0.33	0.67	0.33	0.57	0.50	0.67	0.67	0.57	0.80	0.00	0.67	0.67	0.29	0.33	0.00	0.80
YB	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.29	0.00



	1564	6320	6303	6307	6312H	Dog	Can3	Cepa Y	Brazil	YB
4										
10										
11										
12										
14										
18										
23										
24										
25										
27										
29										
38										
40										
50										
66										
68										
71										
72										
81										
112										
114										
116										
122										
124										
Clon 6										
1510										
1541										
1542										
1558										
1559										
1564	1.00									
6320	0.33	1.00								
6303	0.00	0.00	1.00							
6307	0.40	0.86	0.00	1.00						
6312H	0.00	0.00	0.67	0.00	1.00					
Dog	0.00	0.00	0.80	0.00	0.50	1.00				
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00			
Cepa Y	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	1.00		
Brazil	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	1.00	
YB	0.40	0.29	0.00	0.33	0.00	0.00	0.33	0.33	0.00	1.00





	1564	6320	6303	6307	6312H	Dog	Can3	CepaY	Brazil	YB
4										
10										
11										
12										
14										
18										
23										
24										
25										
27										
29										
38										
40										
50										
66										
68										
71										
72										
81										
112										
114										
116										
122										
124										
Clon 6										
1510										
1541										
1542										
1558										
1559										
1564	1.00									
6320	0.33	1.00								
6303	0.00	0.00	1.00							
6307	0.40	0.86	0.00	1.00						
6312H	0.00	0.00	0.67	0.00	1.00					
Dog	0.00	0.00	0.80	0.00	0.50	1.00				
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00			
Cepa Y	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	1.00		
Brazil	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	1.00	
YB	0.40	0.29	0.00	0.33	0.00	0.00	0.33	0.33	0.00	1.00

## 3. Tomando el MS3 Parcial y corrigiendo el tamaño del alelo de 241pb. en MS6

	4	10	11	12	14	18	23	24	25	27	29	38	40	50	66	68
4	1.00															
10	1.00	1.00														
11	0.86	0.86	1.00													
12	0.67	0.67	0.50	1.00												
14	0.33	0.33	0.40	0.29	1.00											
18	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00										
23	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00									
24	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00								
25	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00	0.86	1.00							
27	0.57	0.57	0.67	0.25	0.80	0.67	0.67	0.57	0.67	1.00						
29	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00	0.86	1.00	0.67	1.00					
38	0.57	0.57	0.67	0.50	0.40	0.67	0.67	0.57	0.67	0.33	0.67	1.00				
40	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00	0.86	0.57	0.86	0.57	1.00			
50	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00	0.86	1.00	0.67	1.00	0.67	0.86	1.00		
66	0.50	0.50	0.57	0.22	0.67	0.57	0.57	0.50	0.57	0.86	0.57	0.29	0.50	0.57	1.00	
68	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00	0.86	1.00	0.67	1.00	0.67	0.86	1.00	0.57	1.00
71	0.57	0.57	0.67	0.25	0.80	0.67	0.67	0.57	0.67	1.00	0.67	0.33	0.57	0.67	0.86	0.67
72	0.86	0.86	1.00	0.50	0.40	1.00	1.00	0.86	1.00	0.67	1.00	0.67	0.86	1.00	0.57	1.00
81	0.67	0.67	0.80	0.57	0.50	0.80	0.80	0.67	0.80	0.40	0.80	0.80	0.67	0.80	0.33	0.80
112	0.57	0.57	0.67	0.50	0.40	0.67	0.67	0.57	0.67	0.33	0.67	0.67	0.57	0.67	0.29	0.67
114	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00	0.86	0.57	0.86	0.57	1.00	0.86	0.50	0.86
116	0.75	0.75	0.86	0.44	0.33	0.86	0.86	0.75	0.86	0.57	0.86	0.57	0.75	0.86	0.50	0.86
122	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00	0.86	0.57	0.86	0.57	1.00	0.86	0.50	0.86
124	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00	0.86	0.57	0.86	0.57	1.00	0.86	0.50	0.86
Clon 6	0.75	0.75	0.86	0.44	0.33	0.86	0.86	0.75	0.86	0.57	0.86	0.86	0.75	0.86	0.50	0.86
1510	0.44	0.44	0.25	0.40	0.29	0.25	0.25	0.44	0.25	0.25	0.25	0.25	0.44	0.25	0.22	0.25
1541	0.40	0.40	0.22	0.36	0.25	0.22	0.22	0.40	0.22	0.22	0.22	0.44	0.40	0.22	0.20	0.22
1542	0.44	0.44	0.25	0.40	0.29	0.25	0.25	0.44	0.25	0.25	0.25	0.50	0.44	0.25	0.22	0.25
1558	0.67	0.67	0.40	0.57	0.50	0.40	0.40	0.67	0.40	0.40	0.40	0.40	0.67	0.40	0.33	0.40
1559	0.33	0.33	0.40	0.29	0.50	0.40	0.40	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40	0.33	0.40	0.33	0.40
1564	0.40	0.40	0.50	0.33	0.67	0.50	0.50	0.40	0.50	0.50	0.50	0.50	0.40	0.50	0.40	0.50
6320	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6303	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6307	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6312H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dog	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa Y	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Brazil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
YB	0.67	0.67	0.80	0.57	0.50	0.80	0.80	0.67	0.80	0.40	0.80	0.80	0.67	0.80	0.33	0.80

	71	72	81	112	114	116	122	124	Clon 6	1510	1541	1542	1559
4													
10													
11													
12													
14													
18													
23													
24													
25													
27													
29													
38													
40													
50													
66													
68													
71	0.57												
72	0.86	0.86											
81	0.67	0.67	0.80										
112	0.57	0.57	0.67	0.50									
114	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33								
116	0.75	0.75	0.86	0.44	0.33	0.86							
122	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86						
124	1.00	1.00	0.86	0.67	0.33	0.86	0.86	1.00					
Clon 6	0.75	0.75	0.86	0.44	0.33	0.86	0.86	0.75	0.86				
1510	0.44	0.44	0.25	0.40	0.29	0.25	0.25	0.44	0.25	0.25			
1541	0.40	0.40	0.22	0.36	0.25	0.22	0.22	0.40	0.22	0.22	0.22		
1542	0.44	0.44	0.25	0.40	0.29	0.25	0.25	0.44	0.25	0.25	0.25	0.50	
1559	0.67	0.67	0.40	0.57	0.50	0.40	0.40	0.67	0.40	0.40	0.40	0.40	0.67
1564	0.33	0.33	0.40	0.29	0.50	0.40	0.40	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40	0.33
1558	0.40	0.40	0.50	0.33	0.67	0.50	0.50	0.40	0.50	0.50	0.50	0.50	0.40
1570	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1587	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6326	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6303 H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6307	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6312H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6320	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DOG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Brazil	0.67	0.67	0.80	0.57	0.50	0.80	0.80	0.67	0.80	0.40	0.80	0.80	0.67
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa Y	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
YB	0.29	0.29	0.33	0.25	0.40	0.33	0.33	0.29	0.33	0.33	0.33	0.33	0.29

	1559	1564	1558	1570	1587	6326	6303 H	6307	6312H	6320	DOG	Brazil	Can3	Cepa Y	YB
4															
10															
11															
12															
14															
18															
23															
24															
25															
27															
29															
38															
40															
50															
66															
68															
71															
72															
81															
112															
114															
116															
122															
124															
Clon 6															
1510															
1541															
1542															
1559	0.67														
1564	0.33	0.33													
1558	0.40	0.40	0.50												
1570	0.00	0.00	0.00	0.00											
1587	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
6326	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
6303 H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
6307	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							
6312H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
6320	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
DOG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
Brazil	0.67	0.67	0.80	0.57	0.50	0.80	0.80	0.67	0.80	0.40	0.80	0.80			
Can3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Cepa Y	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
YB	0.29	0.29	0.33	0.25	0.40	0.33	0.33	0.29	0.33	0.33	0.33	0.33	0.29	0.33	0.57

## I. Matriz de distancia genética basada en índice de similaridad de Nei-Li

## 1. MS3 Completo

	4	10	11	12	14	18	23	24	25	27	29	38	40	50	66	68
4	0.00															
10	0.25	0.00														
11	0.25	0.50	0.00													
12	0.56	0.33	0.78	0.00												
14	1.00	0.67	1.00	0.71	0.00											
18	0.50	0.25	0.50	0.56	0.67	0.00										
23	0.50	0.25	0.50	0.56	0.33	0.25	0.00									
24	0.33	0.11	0.56	0.40	0.43	0.33	0.11	0.00								
25	0.43	0.14	0.43	0.50	0.60	0.14	0.14	0.25	0.00							
27	0.43	0.71	0.43	1.00	0.60	0.71	0.43	0.50	0.67	0.00						
29	0.50	0.25	0.50	0.56	0.67	0.25	0.25	0.33	0.14	0.71	0.00					
38	0.75	0.50	0.75	0.56	0.67	0.50	0.50	0.56	0.43	1.00	0.50	0.00				
40	0.11	0.33	0.33	0.60	0.71	0.56	0.33	0.20	0.50	0.25	0.56	0.78	0.00			
50	0.25	0.50	0.25	0.78	0.67	0.50	0.25	0.33	0.43	0.14	0.50	0.75	0.11	0.00		
66	0.50	0.75	0.50	1.00	0.67	0.75	0.50	0.56	0.71	0.14	0.75	1.00	0.33	0.25	0.00	
68	0.43	0.14	0.43	0.50	0.60	0.14	0.14	0.25	0.00	0.67	0.14	0.43	0.50	0.43	0.71	0.00
71	0.43	0.71	0.43	1.00	0.60	0.71	0.43	0.50	0.67	0.00	0.71	1.00	0.25	0.14	0.14	0.67
72	0.43	0.14	0.43	0.50	0.60	0.14	0.14	0.25	0.00	0.67	0.14	0.43	0.50	0.43	0.71	0.00
81	0.75	0.50	0.75	0.56	0.67	0.50	0.50	0.56	0.43	1.00	0.25	0.50	0.78	0.75	1.00	0.43
112	0.71	0.43	0.71	0.50	0.60	0.43	0.43	0.50	0.33	1.00	0.43	0.43	0.75	0.71	1.00	0.33
114	0.00	0.25	0.25	0.56	1.00	0.50	0.50	0.33	0.43	0.43	0.50	0.75	0.11	0.25	0.50	0.43
116	0.56	0.33	0.56	0.60	0.71	0.33	0.33	0.40	0.25	0.75	0.33	0.56	0.60	0.56	0.78	0.25
122	0.25	0.00	0.50	0.33	0.67	0.25	0.25	0.11	0.14	0.71	0.25	0.50	0.33	0.50	0.75	0.14
124	0.25	0.00	0.50	0.33	0.67	0.25	0.25	0.11	0.14	0.71	0.25	0.50	0.33	0.50	0.75	0.14
Clon 6	0.50	0.25	0.50	0.56	0.67	0.25	0.25	0.33	0.14	0.71	0.25	0.25	0.56	0.50	0.75	0.14
1510	0.78	0.56	1.00	0.60	0.71	0.78	0.78	0.60	0.75	1.00	0.78	0.78	0.80	1.00	1.00	0.75
1541	0.80	0.60	1.00	0.64	0.75	0.80	0.80	0.64	0.78	1.00	0.80	0.60	0.82	1.00	1.00	0.78
1542	0.78	0.56	1.00	0.60	0.71	0.78	0.78	0.60	0.75	1.00	0.78	0.56	0.80	1.00	1.00	0.75
1558	1.00	0.60	1.00	0.67	0.33	0.60	0.60	0.67	0.50	1.00	0.60	0.60	1.00	1.00	1.00	0.50
1559	0.67	0.33	1.00	0.43	0.50	0.67	0.67	0.43	0.60	1.00	0.67	0.67	0.71	1.00	1.00	0.60
1564	1.00	0.67	1.00	0.71	0.50	0.67	0.67	0.71	0.60	1.00	0.67	0.33	1.00	1.00	1.00	0.60
6320	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00
6303	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6307	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71	1.00	1.00	1.00	1.00
6312H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Dog	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71	1.00
Cepa Y	1.00	0.71	1.00	0.75	0.60	0.71	0.71	0.75	0.67	1.00	0.71	0.71	1.00	1.00	0.71	0.67
Brazil	0.67	0.33	0.67	0.43	0.50	0.33	0.33	0.43	0.20	1.00	0.33	0.33	0.71	0.67	1.00	0.20
YB	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71	1.00	1.00	0.71	1.00



	1564	6320	6303	6307	6312H	Dog	Can3	Cepa Y	Brazil	YB
4										
10										
11										
12										
14										
18										
23										
24										
25										
27										
29										
38										
40										
50										
66										
68										
71										
72										
81										
112										
114										
116										
122										
124										
Clon 6										
1510										
1541										
1542										
1558										
1559										
1564	0.00									
6320	0.67	0.00								
6303	1.00	1.00	0.00							
6307	0.60	0.14	1.00	0.00						
6312H	1.00	1.00	0.33	1.00	0.00					
Dog	1.00	1.00	0.20	1.00	0.50	0.00				
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00			
Cepa Y	0.60	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.00		
Brazil	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.60	0.00	
YB	0.60	0.71	1.00	0.67	1.00	1.00	0.67	0.67	1.00	0.00





	1564	6320	6303	6307	6312H	Dog	Can3	Cepa Y	Brazil	YB
4										
10										
11										
12										
14										
18										
23										
24										
25										
27										
29										
38										
40										
50										
66										
68										
71										
72										
81										
112										
114										
116										
122										
124										
Clon 6										
1510										
1541										
1542										
1558										
1559										
1564	0.00									
6320	0.67	0.00								
6303	1.00	1.00	0.00							
6307	0.60	0.14	1.00	0.00						
6312H	1.00	1.00	0.33	1.00	0.00					
Dog	1.00	1.00	0.20	1.00	0.50	0.00				
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00			
Cepa Y	0.60	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.00		
Brazil	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.60	0.00	
YB	0.60	0.71	1.00	0.67	1.00	1.00	0.67	0.67	1.00	0.00

## 3. Tomando el MS3 parcial y corrigiendo tamaño de alelo de 241pb. en MS6

	4	10	11	12	14	18	23	24	25	27	29	38	40	50	66
4	0.00														
10	0.00	0.00													
11	0.14	0.14	0.00												
12	0.33	0.33	0.50	0.00											
14	0.67	0.67	0.60	0.71	0.00										
18	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00									
23	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00								
24	0.00	0.00	0.14	0.33	0.67	0.14	0.14	0.00							
25	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00	0.14	0.00						
27	0.43	0.43	0.33	0.75	0.20	0.33	0.33	0.43	0.33	0.00					
29	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00	0.14	0.00	0.33	0.00				
38	0.43	0.43	0.33	0.50	0.60	0.33	0.33	0.43	0.33	0.67	0.33	0.00			
40	0.00	0.00	0.14	0.33	0.67	0.14	0.14	0.00	0.14	0.43	0.14	0.43	0.00		
50	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00	0.14	0.00	0.33	0.00	0.33	0.14	0.00	
66	0.50	0.50	0.43	0.78	0.33	0.43	0.43	0.50	0.43	0.14	0.43	0.71	0.50	0.43	0.00
68	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00	0.14	0.00	0.33	0.00	0.33	0.14	0.00	0.43
71	0.43	0.43	0.33	0.75	0.20	0.33	0.33	0.43	0.33	0.00	0.33	0.67	0.43	0.33	0.14
72	0.14	0.14	0.00	0.50	0.60	0.00	0.00	0.14	0.00	0.33	0.00	0.33	0.14	0.00	0.43
81	0.33	0.33	0.20	0.43	0.50	0.20	0.20	0.33	0.20	0.60	0.20	0.20	0.33	0.20	0.67
112	0.43	0.43	0.33	0.50	0.60	0.33	0.33	0.43	0.33	0.67	0.33	0.33	0.43	0.33	0.71
114	0.00	0.00	0.14	0.33	0.67	0.14	0.14	0.00	0.14	0.43	0.14	0.43	0.00	0.14	0.50
116	0.25	0.25	0.14	0.56	0.67	0.14	0.14	0.25	0.14	0.43	0.14	0.43	0.25	0.14	0.50
122	0.00	0.00	0.14	0.33	0.67	0.14	0.14	0.00	0.14	0.43	0.14	0.43	0.00	0.14	0.50
124	0.00	0.00	0.14	0.33	0.67	0.14	0.14	0.00	0.14	0.43	0.14	0.43	0.00	0.14	0.50
Clon 6	0.25	0.25	0.14	0.56	0.67	0.14	0.14	0.25	0.14	0.43	0.14	0.14	0.25	0.14	0.50
1510	0.56	0.56	0.75	0.60	0.71	0.75	0.75	0.56	0.75	0.75	0.75	0.75	0.56	0.75	0.78
1541	0.60	0.60	0.78	0.64	0.75	0.78	0.78	0.60	0.78	0.78	0.78	0.56	0.60	0.78	0.80
1542	0.56	0.56	0.75	0.60	0.71	0.75	0.75	0.56	0.75	0.75	0.75	0.50	0.56	0.75	0.78
1559	0.33	0.33	0.60	0.43	0.50	0.60	0.60	0.33	0.60	0.60	0.60	0.60	0.33	0.60	0.67
1564	0.67	0.67	0.60	0.71	0.50	0.60	0.60	0.67	0.60	0.60	0.60	0.60	0.67	0.60	0.67
1558	0.60	0.60	0.50	0.67	0.33	0.50	0.50	0.60	0.50	0.50	0.50	0.50	0.60	0.50	0.60
1570	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1587	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6326	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6303 H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6307	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6312H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6320	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DOG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Brazil	0.33	0.33	0.20	0.43	0.50	0.20	0.20	0.33	0.20	0.60	0.20	0.20	0.33	0.20	0.67
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71
Cepa Y	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71
YB	0.71	0.71	0.67	0.75	0.60	0.67	0.67	0.71	0.67	0.67	0.67	0.67	0.71	0.67	0.43

	68	71	72	81	112	114	116	122	124	Clon 6	1510	1541	1542	1559
4														
10														
11														
12														
14														
18														
23														
24														
25														
27														
29														
38														
40														
50														
66														
68	0													
71	0.3	0												
72	0	0.3	0											
81	0.2	0.6	0.2	0										
112	0.3	0.7	0.3	0.2	0									
114	0.1	0.4	0.1	0.3	0.4	0								
116	0.1	0.4	0.1	0.3	0.4	0.3	0							
122	0.1	0.4	0.1	0.3	0.4	0	0.3	0						
124	0.1	0.4	0.1	0.3	0.4	0	0.3	0	0					
Clon 6	0.1	0.4	0.1	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0				
1510	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.78	0			
1541	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.56	0.2	0.09	0	
1542	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.67	0.43	0.5	0.43	0
1559	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.3	0.7	0.3	0.3	0.67	0.71	0.75	0.71	0.5
1564	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.67	0.71	0.75	0.71	0.5
1558	0.5	0.5	0.5	0.3	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.67	0.71	0.67	0.33
1570	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1587	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6326	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6303 H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6307	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6312II	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6320	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DOG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Brazil	0.20	0.60	0.20	0.00	0.20	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.71	0.75	0.71	0.50
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cepa Y	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
YB	0.67	0.67	0.67	0.60	0.67	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.75	0.78	0.75	0.60

	1564	1558	1570	1587	6326	6303 H	6307	6312H	6320	DOG	Brazil	Can3	Cepa Y	YB
4														
10														
11														
12														
14														
18														
23														
24														
25														
27														
29														
38														
40														
50														
66														
68														
71														
72														
81														
112														
114														
116														
122														
124														
Clon 6														
1510														
1541														
1542														
1559														
1564	0													
1558	0.33	0												
1570	1.00	1.00	0.00											
1587	1.00	1.00	1.00	0.00										
6326	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00									
6303 H	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.00								
6307	0.67	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.00							
6312H	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.50	1.00	0						
6320	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33	1.00	0					
DOG	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.33	1.00	0.5	1.00	0				
Brazil	0.50	0.33	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0			
Can3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0		
Cepa Y	0.60	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.71	1.00	0.6	1.00	1.00	0.67	0	
YB	0.60	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.6	0.67	0.67	0

## J. Genotipos de aislados de *T. cruzi* por país

### 1. Leyenda de asignación de genotipos

#### a. Muestras con MS3 parcial

- Asignación de posibles genotipos

Posibles genotipos MS5	No. asignado de genotipo	Posibles genotipos MS3	No. asignado de genotipo	Posibles genotipos MS6	No. asignado de genotipo
0/0	1	0/0	1	0/0	1
227/227	2	190/190	2	240/240	2
230/230	3	190/192	3	240/241	3
230/236	4	192/192	4	241/241	4
230/239	5	190/186	5	240/242	5
231/231	6	191/191	6	242/242	6
235/235	7	154/154	7	245/254	7
236/236	8	154/172	8	237/237	8
231/236	9	188/188	9	245/245	9
236/239	10	188/192	10	244/244	10
239/239	11	198/198	11	239/239	11
221/236	12	178/178	12		
227/236	13	186/186	13		
237/237	14				
234/237	15				
232/232	16				
238/238	17				

- Asignación de genotipos totales

Genotipo	No. asignado a genotipo
111	1
112	2
312	3
322	4
324	5
325	6
332	7
342	8
362	9
422	10

Genotipo	No. asignado a genotipo
424	11
482	12
612	13
624	14
654	15
812	16
11 1 2	17
12 9 5	18
14 1 1	19
8 10 5	20

Genotipo	No. asignado a genotipo
11 11 7	21
11 11 9	22
13 10 5	23
14 12 8	24
15 12 8	25
17 13 2	26
7 13 11	27
16 13 10	28

b. Muestras con MS3 parcial y corrección del tamaño del alelo 241pb. en MS6

• Asignación de posibles genotipos

Posibles genotipos MS5	No. asignado de genotipo	Posibles genotipos MS3	No. asignado de genotipo	Posibles genotipos MS6	No. asignado de genotipo
0/0	1	0/0	1	0/0	1
227/227	2	190/190	2	240/240	2
230/230	3	190/192	3	240/242	3
230/236	4	192/192	4	245/254	4
230/239	5	190/186	5	237/237	5
231/231	6	191/191	6	245/245	6
235/235	7	154/154	7	244/244	7
236/236	8	154/172	8	239/239	8
231/236	9	188/188	9		
236/239	10	188/192	10		
239/239	11	198/198	11		
221/236	12	178/178	12		
227/236	13	186/186	13		
237/237	14				
234/237	15				
232/232	16				
238/238	17				

• Asignación de genotipos totales

Genotipo	No. asignado a genotipo
111	1
422	2
112	3
115	4
312	5
322	6
323	7
332	8
342	9

Genotipo	No. asignado a genotipo
362	10
482	11
612	12
622	13
652	14
812	15
11 1 2	16
11 1 1 1	17
11 1 1 4	18

Genotipo	No. asignado a genotipo
12 9 3	19
13 10 3	20
14 1 5	21
14 12 6	22
15 12 1	23
16 13 7	24
17 13 8	25
7 13 2	26
8 10 3	27

## 2. Genotipos correspondiente de muestras analizadas

## a. Muestras con MS3 parcial

País	Depto	Muestra	Genotipo final (MS5,3,6)	Genotipo asignado
Guatemala	Jutiapa	4	424	11
	Jutiapa	38	342	8
	Jutiapa	50	324	5
	Jutiapa	72	322	4
	Zacapa	10	422	10
	Zacapa	11	324	5
	Zacapa	12	482	12
	Zacapa	14	612	13
	Chiquimula	18	322	4
	Chiquimula	24	422	10
	Chiquimula	40	424	11
	Chiquimula	81	312	3
	Chiquimula	112	362	9
	Sta. Rosa	23	422	10
	Sta. Rosa	25	322	4
	Sta. Rosa	27	624	14
	Sta. Rosa	29	322	4
	Sta. Rosa	Clon 6	332	7
	Jalapa	66	654	15
	Jalapa	68	322	4
Jalapa	71	624	14	
Baja Verapaz	114	424	11	
Baja Verapaz	116	325	6	
Baja Verapaz	122	422	10	
Baja Verapaz	124	422	10	
Panamá	--	1510	12 9 5	18
	--	1541	13 10 5	23
	--	1542	8 10 5	20
	--	1558	112	2
	--	1559	812	16
	--	1564	11 1 2	17
	--	1570	1 1 1	1
	--	1587	1 1 1	1

País	Depto	Muestra	Genotipo final (MS5,3,6)	Genotipo asignado
Ecuador	--	6320	11 11 7	21
	--	6326	1 1 1	1
	--	6303	14 12 8	24
	--	6307	11 11 9	22
	--	6312H	14 1 1	19
	--	Dog	15 12 8	25
Brasil	--	Can3	16 13 10	28
	--	Cepa Y	17 13 2	26
	--	Brazil	3 1 2	3
	--	YB	7 13 11	27

- b. Muestras con MS3 parcial y corrección del tamaño del alelo de 241pb.  
en MS6

País	Depto	Muestra	Genotipo final (MS5,3,6)	Genotipo asignado
Guatemala	Jutiapa	4	422	2
	Jutiapa	38	342	9
	Jutiapa	50	322	6
	Jutiapa	72	322	6
	Zacapa	10	422	2
	Zacapa	11	322	6
	Zacapa	12	482	11
	Zacapa	14	612	12
	Chiquimula	18	322	6
	Chiquimula	24	422	2
	Chiquimula	40	422	2
	Chiquimula	81	312	5
	Chiquimula	112	362	10
	Sta. Rosa	23	322	6
	Sta. Rosa	25	322	6
	Sta. Rosa	27	622	13
	Sta. Rosa	29	322	6
	Sta. Rosa	Clon 6	332	8
	Jalapa	66	652	14
	Jalapa	68	322	6
Jalapa	71	622	13	
Baja Verapaz	114	422	2	
Baja Verapaz	116	323	7	
Baja Verapaz	122	422	2	
Baja Verapaz	124	422	2	
Panamá	--	1510	12 9 3	19
	--	1541	13 10 3	20
	--	1542	8 10 3	27
	--	1558	112	3
	--	1559	812	15
	--	1564	11 1 2	16
	--	1570	111	1
	--	1587	111	1

<b>País</b>	<b>Depto</b>	<b>Muestra</b>	<b>Genotipo final (MS5,3,6)</b>	<b>Genotipo asignado</b>
Ecuador	--	6320	11 11 1	17
	--	6326	115	4
	--	6303	14 12 6	22
	--	6307	11 11 4	18
	--	6312H	14 1 5	21
	--	Dog	15 12 1	23
Brasil	--	Can3	16 13 7	24
	--	Cepa Y	17 13 8	25
	--	Brazil	3 12	5
	--	YB	7 13 2	26