

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estudio del ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* entre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* mediante la tipificación genética de este parásito.

Laura María Grajeda Díaz

Guatemala
2006

Estudio del ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* entre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* mediante la tipificación genética de este parásito.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estudio del ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* entre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* mediante la tipificación genética de este parásito.

Trabajo de investigación presentado por
Laura María Grajeda Díaz
Para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala
2006

Vo.Bo.:

(f) Pamela Pennington

Dra. Pamela Marie Pennington de Sánchez

Tribunal Examinador:

(f) Pamela Pennington

Dra. Pamela Marie Pennington de Sánchez

(f) Celia Cerdón Rosales

Lic. Celia Cerdón-Rosales

(f) Pamela Pennington

Dra. Pamela Marie Pennington de Sánchez por Dr. Héctor Aguilar

Fecha de Aprobación: Guatemala 7 de diciembre 2006

PREFACIO

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. Pamela Marie Pennington de Sánchez por la confianza y apoyo que mostró en mí desde ese primer día. Su acompañamiento en cada momento fue muy valioso, me llenó de experiencias y conocimiento pero lo más satisfactorio fue la relación que pudimos construir. Agradezco también a la Dra. Ellen Dotson por haberme recibido en su institución, en su casa y dentro de su familia, esas semanas que compartimos fueron inolvidables y llenas de cariño. A la Dra. Alejandra Estévez por su ayuda incondicional, por los conocimientos y tips que me acompañaron en cada momento y sobretodo por su amistad. A Ale K, Calu, Rodrigo, Luis, Lily, Renata, Bernarda y Claudia por el día a día, por el apoyo y por el siempre estar dispuestos a ayudar. A Mélany, Lucía y Mishel por el cariño, por los buenos y malos momentos que compartimos, por ese camino que recorrimos siempre juntas; las llevo en el corazón eternamente. A Isabel, Adriana, Lore, Ana Lucía y Gaby por estar conmigo siempre y ser parte mi familia.

Dedico esta tesis a mi familia, mis papás Rubén y María del Carmen, mis hermanas Rita María y Claudia María. Les agradezco su amor, comprensión y paciencia a lo largo de este caminar.

CONTENIDO

	Página
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Enfermedad de Chagas	2
B. Vectores	4
C. Tripanosomas	8
1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2. <i>Trypanosoma rangeli</i>	15
3. Diferenciación de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma rangeli</i> mediante ADN del minicírculo	17
D. Variabilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1. Comportamiento biológico	20
2. Análisis evolutivo	23
3. Características bioquímicas	28
4. Características moleculares	29
E. ADN altamente repetitivo	33
1. Satélites	33
2. Minisatélites	34
3. Microsatélites	34
4. Trabajos realizados en Guatemala	38
F. Recursos disponibles para esta tesis	39
1. Recolección de muestras y extracción de ADN	39
2. Preparación de control positivo	39
3. Análisis de minicírculo, miniexón y microsatélites	40
III. Justificación	42
IV. Objetivos	43
V. Hipótesis	44
VI. Metodología	45

A.	Diagrama de flujo	45
B.	Procedimiento	46
1.	Análisis de minicírculo	46
2.	Análisis microsátélites	46
VII.	Resultados y discusión	50
A.	Análisis de minicírculo	50
1.	PCR y tamizaje	50
B.	Análisis de microsátélites	55
1.	PCR y tamizaje	55
2.	Análisis de fragmentos por electroforesis capilar	60
3.	Cálculos estadísticos	63
VIII.	Conclusiones	70
IX.	Recomendaciones	71
X.	Literatura citada	72
XI.	Apéndices	86
A.	Recursos disponibles para esta tesis	86
B.	Protocolo para geles de poliacrilamida	89
1.	PAGE	89
2.	Revelado con tinción plata	94
C.	Estrategias para evitar la contaminación del PCR anidado	95
D.	Reglas de selección de picos reales en los programas GeneScan y Genotyper	96
E.	Listado de muestras según lugar de análisis por electroforesis capilar	97
F.	Electroferogramas de las muestras positivas	98
XII.	Glosario	113

Lista de cuadros

	Página
1. Clasificación sistemática de los tripanosomas según The Taxomicon & Sistema Naturae, 2000.	9
2. Diferencias entre el género <i>Rhodnius</i> y <i>Triatoma</i> .	28
3. Tamizaje de amplificación del mini-exón con TC1, TC2 y TC en muestras de <i>T. cruzi</i> cultivadas de triatominos durante la encuesta entomológica basal en Guatemala.	32
4. Clasificación de las secuencias de ADN repetidas en tandem.	33
5. Verificación de especies en las muestras de heces.	50
6. Comparación entre el número de muestras de cada vector que amplificaron con el marcador del minicírculo.	52
7. Detección de <i>T. cruzi</i> según marcador basado en minicírculo o en microsatélite.	53
8. Evaluación de la detección de <i>T. cruzi</i> mediante el método basado en la secuencia del minicírculo usando como estándar de oro en los resultados obtenidos por el análisis de microsatélites.	54
9. Detección de <i>T. cruzi</i> en muestras de <i>T. dimidiata</i> según marcador basado en microsatélite o minicírculo.	55
10. Detección de <i>T. cruzi</i> en muestras de <i>R. prolixus</i> según marcador basado en microsatélite o minicírculo.	55
11. Identificación de secuencias homólogas en el genoma de <i>T. cruzi</i> .	56
12. Criterios evaluados para la selección de los cebadores externos.	57
13. Frecuencia de alelos nulos en microsatélites.	65
14. Comparación génica y genotípica entre <i>T. cruzi</i> aislados de <i>R. prolixus</i> (n = 11) y <i>T. dimidiata</i> (n = 24).	67
15. Listado de muestras del departamento de Chiquimula.	86
16. Listado de muestras según lugar de análisis por electroforesis capilar.	97

Lista de figuras

	Página
1. Personas en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas en Guatemala.	3
2. Principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala.	5
3. Distribución de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma dimidiata</i> en Centro América.	6
4. Árbol filogenético de los kinetoplastos a partir de secuencia 18S ribosomal.	10
5. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	11
6. Componentes celulares de <i>T. cruzi</i> .	12
7. Red de minicírculos del kinetoplasto en la base del flagelo emergente en una forma epimastigota.	13
8. Diferenciación morfológica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	13
9. Morfología de <i>Trypanosoma rangeli</i> .	16
10. Comparación entre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> .	16
11. Traslape entre la distribución de la enfermedad de Chagas y los lugares en donde se ha reportado <i>Trypanosoma rangeli</i> .	17
12. Alineación del ADN del minicírculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma rangeli</i> .	18
13. Esquema del ADN de minicírculo de <i>T. cruzi</i> .	19
14. Tiempos estimados de divergencia para los ribocladados de <i>Trypanosoma cruzi</i> y su correlación con grupos definidos mediante otros métodos.	25
15. Especiación de <i>T. cruzi</i> basado en la separación geográfica de las Américas y su asociación ecológica con diferentes reservorios.	25
16. Especiación de <i>T. cruzi</i> basada en alguna separación geográfica de América del Sur o su asociación ecológica con diferentes vectores.	26
17. Esquema de la estrategia de amplificación del gen miniexón y localización de sondas específicas para determinar el grupo al que pertenece.	31
18. Deslizamiento de hebra durante la replicación del ADN repetitivo.	36

19.	Secuencia de referencia del locus MS3.	40
20	Secuencia de referencia del locus MS5.	41
21.	Diagrama de flujo del procedimiento a seguir.	45
22.	Electroferograma que muestra los alelos de un microsatélite dinucleótido.	47
23.	Fragmentos obtenidos en la electroforesis capilar debidos a adiciones de adenina por la polimerasa.	48
24.	Fragmentos múltiples de la repetición del microsatélite pero que son artefactos de PCR creados por la polimerasa (stturers).	49
25.	Detección de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> en heces de vectores.	51
26.	Alineación de secuencias homólogas a MS3 en el genoma de <i>T. cruzi</i> .	57
27.	Diseño del PCR en un solo tubo para la amplificación anidada de microsatélites.	59
28.	Ejemplo de muestras tamizadas en el CDC y que presentó la base cuadrada y fluorescencia negativa.	61
29.	Diferencia en la detección de alelos considerando que se encuentran en la misma proporción uno de otro pero que la cantidad de ADN inicial es diferente (el límite de detección es de 50 unidades de fluorescencia).	62
30.	Procedimiento para la normalización de alelos.	62
31.	Distribución de alelos para el locus MS5.	63
32.	Distribución de alelos para el locus MS5 (frecuencia porcentual).	64
33.	Distribución de alelos para el locus MS3.	64
34.	Distribución de alelos para el locus MS3 (frecuencia porcentual).	64
35.	Árbol filogenético que relaciona aislado de <i>T. cruzi</i> de heces de <i>R. prolixus</i> y <i>T. dimidiata</i> .	66
36.	Mapa del departamento de Chiquimula en donde se señalan los municipios muestreados.	86

RESUMEN

Entre el género de los *Trypanosomas* se encuentran las especies *T. cruzi* y *T. rangeli*, la primera es la causante de la enfermedad de Chagas mientras que la segunda es un parásito no patogénico para humanos. Ambos son transmitidos por insectos de la familia Reduviidae. En Guatemala los principales vectores de *T. cruzi* son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Se ha observado que los vectores tienen diferentes hábitats, nichos, focos y reservorios siendo *R. prolixus* arborícola y *T. dimidiata* terrestre. Además, en Sur América se identificaron dos grandes linajes de *T. cruzi* asociados los ciclos de transmisión arbóreo y terrestre. Esto permite sugerir la existencia de coespeciación vector-parásito lo que a su vez se traduce en que cada vector transmite diferentes cepas. Es determinante comprobar esta hipótesis porque indicaría que los ciclos de transmisión son diferentes y que por lo tanto las estrategias de control, prevención y tratamiento deben ajustarse al vector involucrado. Mediante la secuencia del minicírculo se encontró que *R. prolixus* está principalmente infectado con *T. rangeli* (59/72, 81.94%) y *T. dimidiata* con *T. cruzi* (31/31, 100%). Mediante microsatélites se comprobó que existe diferencia génica ($p = 0.00000$) y genotípica ($p = 0.00517$) entre las poblaciones de *T. cruzi* aisladas con uno u otro insecto. Estos resultados apoyan la hipótesis, sin embargo debido a la presencia de *T. rangeli* solo se analizaron 34 muestras, para aumentar la significancia estadística se recomienda aumentar el número.

I. INTRODUCCIÓN

Entre el género de los *Trypanosomas* se encuentra la especie *T. cruzi* y la *T. rangeli*, el primero es el causante de la enfermedad de Chagas, la cual afecta a 18 millones de personas en Latinoamérica (WHO, 1991), mientras que el segundo es un parásito entomopatógeno no patogénico para humanos. Ambos parásitos son transmitidos por insectos de la familia Reduviidae.

En Guatemala destacan como principales vectores *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. *R. prolixus* es considerada una especie doméstica en Guatemala, ya que no se han identificado focos silvestres. Su nicho silvestre es arborícola y los principales reservorios asociados a este nicho son marsupiales. *T. dimidiata* se encuentra en hábitats domésticos y silvestres, siendo considerado un vector cavernícola asociado posiblemente a roedores (Nakagawa *et al*, 1999).

Con base en estudios moleculares, bioquímicos y biológicos, se ha descrito una amplia variabilidad genética en *T. cruzi*. Se han diferenciado dos grandes linajes de *T. cruzi*, los cuales se han asociado a diferentes ciclos de transmisión: el TCI se ha encontrado en ecótopos tanto silvestres como domésticos en toda América y el TCII en ecótopos domésticos, principalmente en Sur América. Gaunt y Miles propusieron en el 2000 una asociación entre *Rhodnius* spp. Y TCI y *T. rangeli* y entre miembros de la tribu Triatomini y TCII. Esto permite sugerir la existencia de coespeciación vector-parásito (Gaunt & Miles, 2000).

Para este estudio se propuso utilizar microsatélites para estudiar la diversidad genética de *T. cruzi* en los principales vectores: *R. prolixus* y *T. dimidiata*. Debido a la potencial infección de *R. prolixus* con *T. rangeli*, se utilizaron métodos moleculares para verificar la especie en el vector. Esta información permitirá determinar si hay diferencia en los ciclos de transmisión asociados a estos vectores.

II. ANTECEDENTES

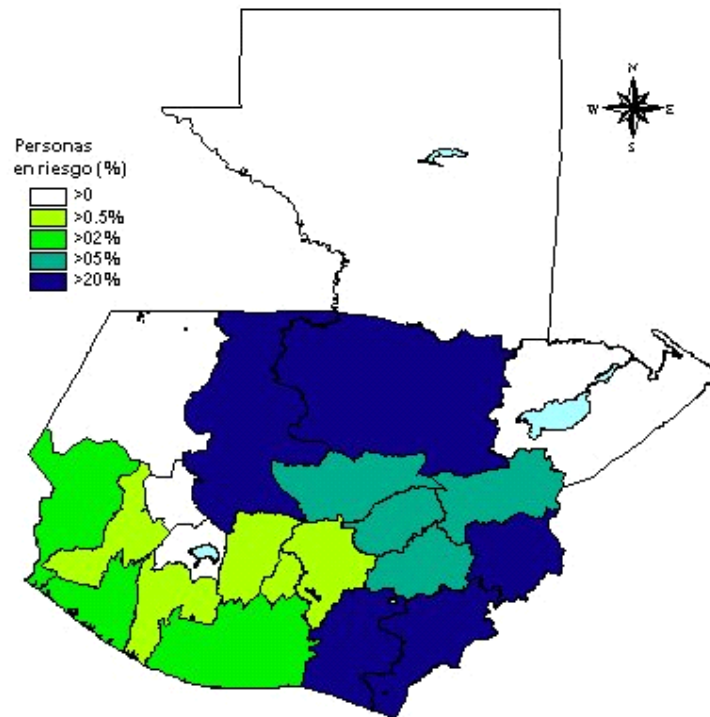
A. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, en Minas Gerais, Brasil. Es una enfermedad crónica debilitante que afecta la salud, el bienestar y la productividad de un gran número de seres humanos y representa un problema de salud pública en América Latina. Se estima que en Latinoamérica 16 a 18 millones de personas son infectadas por la enfermedad de Chagas y de los infectados, 50,000 morirán cada año (CDC, 2003). Según el Informe de Desarrollo Humano del PNUD (1993), un promedio del Producto Interno Bruto per Cápita Anual calculado a nivel de América Latina son US\$ 2,966. La pérdida económica para el continente debido a la mortalidad y la discapacidad temprana por esta enfermedad los adultos de la edad productiva, asciende a US\$ 8,156 millones que equivale al 2,5% de la deuda externa del Continente entero en 1995. En la República de Guatemala se estima que 730,000 personas están infectadas y la incidencia anual estimada es de 30,000 casos (OPS, 2000), hacer referencia a figura 1.

La infección se propaga a los seres humanos de varias maneras: la principal ocurre después de la picadura de una “chinche picuda” que deposita heces en la piel de la persona y cuando ésta se frota introduce los parásitos en la herida, o bien puede infectarse cuando las heces están en contacto con un corte abierto, ojos o boca. La “chinche picuda” o el vector de la enfermedad de Chagas, es un insecto hematófago de la familia *Reduviidae*. En Guatemala se han observado tres especies: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. La infección también puede darse por vía oral cuando los alimentos están contaminados con heces infectadas, vía congénita o mediante transfusión de sangre o transplante de órganos. Los mamíferos

pueden infectarse de la misma forma y contribuir con el ciclo de la enfermedad (CDC, 2003).

Figura 1: Personas en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas en Guatemala



(Adpatado de Tabaru, 1999)

La enfermedad se desarrolla en tres etapas las cuales involucran síntomas diferentes, no obstante algunas personas pueden infectarse y nunca presentarlos. La primera etapa, la fase aguda presenta síntomas únicamente en el 1% de los casos. Frecuentemente se observa el signo de mazza-romaña, o Chagoma de inoculación, además pueden haber manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades como son fatiga, fiebre, inflamación del hígado o bazo o hinchazón de los nódulos linfáticos. A veces ocurren erupciones cutáneas, pérdida de apetito, diarrea o vómitos. Las manifestaciones clínicas son más frecuentemente observadas en niños, donde la enfermedad puede ser mortal. En esta fase, las formas tripomastigotes pueden ser detectados en sangre debido a los elevados niveles de parasitemia

que se presentan, los cuales son controlados posteriormente por la respuesta inmune. Esta respuesta no erradica completamente al parásito, manteniéndose una parasitemia subpatente durante toda la vida del hospedero. En general, los síntomas persisten por 4 a 8 semanas y, luego desaparecen, incluso sin tratamiento (CDC, 2003).

Una vez superada la etapa aguda los individuos infectados pasan por un período sin sintomatología clínica, llamada fase indeterminada o asintomática. Aproximadamente el 70 % de los pacientes infectados permanece así durante toda su vida, conviviendo con el parásito, sin desarrollar daños importantes en sus tejidos. La seroreactividad para *T. cruzi* es lo único que diferencia clínicamente a un paciente asintomático de un individuo normal (Rodríguez *et al*, 2004).

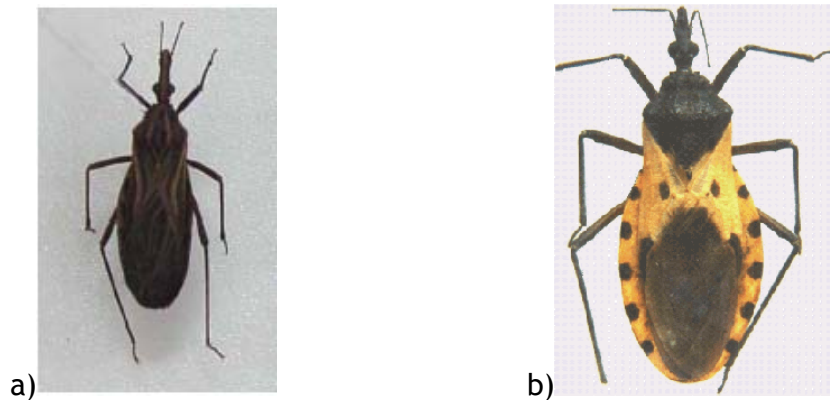
Aproximadamente un 30% de los pacientes desarrollan la fase sintomática o crónica, esto ocurre 10 a 20 años después de la infección inicial. Este período se caracteriza por la lenta evolución y por el daño cardíaco o dilatación de vísceras, frecuentemente esófago y colon a lo cual se le llama megaesófago y megacolon respectivamente. Esto resulta en problemas al tragar o estreñimiento agudo. Los pacientes que desarrollan miocardiopatía, usualmente mueren a causa de una insuficiencia cardíaca, por arritmias graves, falla coronaria o trastornos de conducción avanzados (CDC, 2003; Rodríguez *et al*, 2004).

B. Vectores

Los vectores de la enfermedad de Chagas, *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), y *Triatoma nitida* (Usinger, 1939), son insectos hematófagos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*, hacer referencia a figura 2.

En la actualidad se conocen 6 especies de triatominos distribuidas en 21 de los 22 Departamentos del país (Marroquín y Juárez, 2003). Se considera a *R. prolixus* y *T. dimidiata* como las dos especies de importancia epidemiológica (Schofield y Dujardin, 1997), mientras que *T. nitida* parece no ser un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad ya que es escaso, produce infestaciones menores, (Monroy *et al*, 2003) y su comportamiento limita su capacidad vectorial (Galvao *et al*, 1995).

Figura 2: Principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala. a) *Rhodnius prolixus*, b) *Triatoma dimidiata*



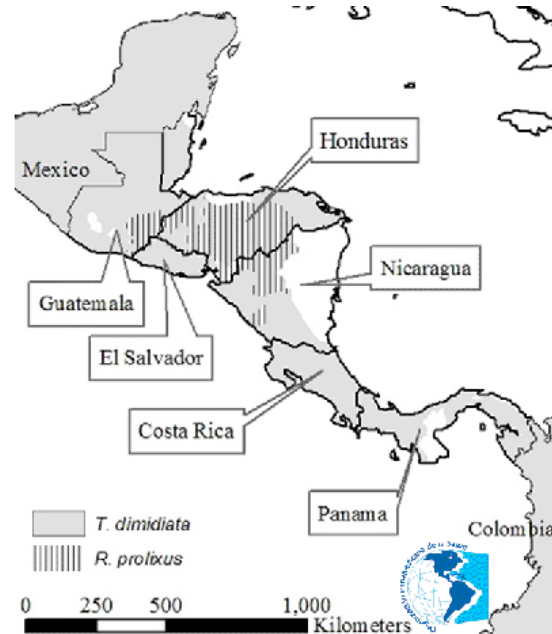
(Adaptado de Organización Panamericana de la Salud, 2004)

Rhodnius prolixus es uno de los vectores más eficientes en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* y fue una de las primeras especies del género *Rhodnius* en ser descrita, a partir de especímenes domésticos colectados en viviendas del norte de Venezuela. Es el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Venezuela y Colombia, así como en varios países de América Central y el Sur de México, no obstante su localización esta focalizada, hacer referencia a figura 3 (Marroquín y Juárez, 2003). El primer reporte de *Rhodnius prolixus* en América Central fue en El Salvador (Neiva, 1936).

La distribución geográfica de *T. dimidiata* en Latinoamérica va desde el sur de México hasta Colombia y Venezuela, hacer referencia a figura 3

(Schofield y Dujardin, 1997). En 1933 se reportó por primera vez la presencia en Guatemala de *Triatoma dimidiata* (Latreille,1811) y *Triatoma nitida* (Usinger, 1939), los cuales estaban asociados con la enfermedad de Chagas (Reichenow 1933).

Figura 3: Distribución de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en Centro América



(Adaptado de Organización Panamericana de la Salud, 2004)

La distribución geográfica de *T. dimidiata* en Latinoamérica va desde el sur de México hasta Colombia y Venezuela, hacer referencia a figura 3 (Schofield y Dujardin, 1997). En 1933 se reportó por primera vez la presencia en Guatemala de *Triatoma dimidiata* (Latreille,1811) y *Triatoma nitida* (Usinger, 1939), los cuales estaban asociados con la enfermedad de Chagas (Reichenow 1933).

Se encontró *T. dimidiata* en 16 de los 22 departamentos del país y *R. prolixus* en 4 (Tabaru *et al*, 1999) y según el Programa Nacional para el Control de Chagas hay vectores en 21 departamentos, quedando excluido únicamente Totonicapán. Es claro que los insectos predominan en la región central y oriental, como Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Zacapa.

También se encontraron algunas aldeas con densas poblaciones de chinches en el occidente en Quiche y en el norte de Alta Verapaz. Del total de insectos colectados en ese estudio, 64.6% corresponden a *T. dimidiata*, 30.7% a *R. prolixus* y 4.7% a *T. nitida*. *T. dimidiata* se colectó en 16 de los 22 departamentos, *R. prolixus* en 5 y *T. nitida* en 3. Así, en esta y otras publicaciones, se ha observado que *T. dimidiata* está más ampliamente distribuido que *R. prolixus* (Tabaru *et al*, 1999).

En Centroamérica *R. prolixus* es estrictamente domiciliar y sus poblaciones son genéticamente muy restringidas, inhábiles de colonizar diferentes hábitats (Schofield y Dujardin, 1997). Se asocia principalmente con viviendas construidas con material vegetal, frecuentemente es encontrado en la cara interna de los techos y paredes de palma, donde son muy activos y están protegidos de los factores climáticos (Tabaru *et al*, 1999). *T. dimidiata*, por su lado, se encuentra en casas de adobe y bajareque y se desarrolla en el área domiciliar, peridomiciliar y selvática (Zeledón, 1981). Los vectores no son comunes en casa de bloques de concreto (Tabaru *et al*, 1999). La estricta condición intradomiciliar de *R. prolixus* los hace susceptibles a los insecticidas de acción residual y a los cambios socioeconómicos de modo que permite tener un mejor control vectorial.

Se ha sugerido que los vectores pueden diferir en su habilidad de transmitir *T. cruzi* y esto se ha evidenciado mediante varios aspectos. Uno de estos es que se han encontrado diferentes frecuencias de infecciones en humanos dependiendo del vector con el que están relacionados. En el departamento de Zacapa, donde *R. prolixus* es el principal vector, la seroprevalencia fue de 38.8% mientras que en Santa Rosa, donde habita *T. dimidiata*, se encontró tan solo el 8.9% (Paz-Bailey *et al*, 2002). Otro es que se ha reportado que *R. prolixus* esta más frecuentemente infectado y se encuentra en mayores densidades que *T. dimidiata* (Ponce, 1999; WHO, 2002). En 1999 se encontró que aproximadamente el 39% de *T. dimidiata* y el 57.6% de *R. prolixus* estaban infectados con *T. cruzi* (Dorn *et al*, 1999). Estos estudios proponen a *R. prolixus* como principal vector de la enfermedad de

Chagas en Guatemala. Sin embargo, se ha reportado que el comportamiento biológico de *R. prolixus* respecto a patrones de alimentación y defecación no evidencian una coespeciación con *T. cruzi* que favorezca su transmisión (Takano y Edman, 2002). Al contrario, hay evidencia de coespeciación de cepas de *T. rangeli* con algunas especies de *Rhodnius* (Urrea *et al*, 2005). Además *T. dimidiata* tiene la ventaja de que esta más ampliamente distribuido en Guatemala y que está adaptado tanto al ciclo selvático como el doméstico.

C. Tripanosomas

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Trypanosoma es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género Trypanosoma se ha dividido en dos grupos (Hoare, 1972). El primero, llamado Stercoraria, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo se encuentra a *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*. (Rodríguez *et al*, 2004). Hacer referencia a cuadro 1 con la clasificación sistemática de los tripanosomas. En la figura 4 se muestra el árbol filogenético de los trypanosomas construido a partir del análisis de máxima parsimonia de las secuencias 18S ribosomales de 22 kinetoplastos. Se presentan los valores de Bootstrap para todas las ramas y nodos principales que son mayores a 50%.

1. *Trypanosoma cruzi*. El *T. cruzi* fue observado por primera vez en Guatemala, en 1932 por el Dr. Eduardo Reichenow, al realizar un examen de gota gruesa a dos niños en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa, al

investigar malaria. Posteriormente el Dr. Romeo De León confirmó la presencia de este parásito en el país en 1935 (Marroquín & Juárez, 2003).

Cuadro 1: Clasificación sistemática de los tripanosomas según The Taxomicon & Sistema Naturae, 2000.

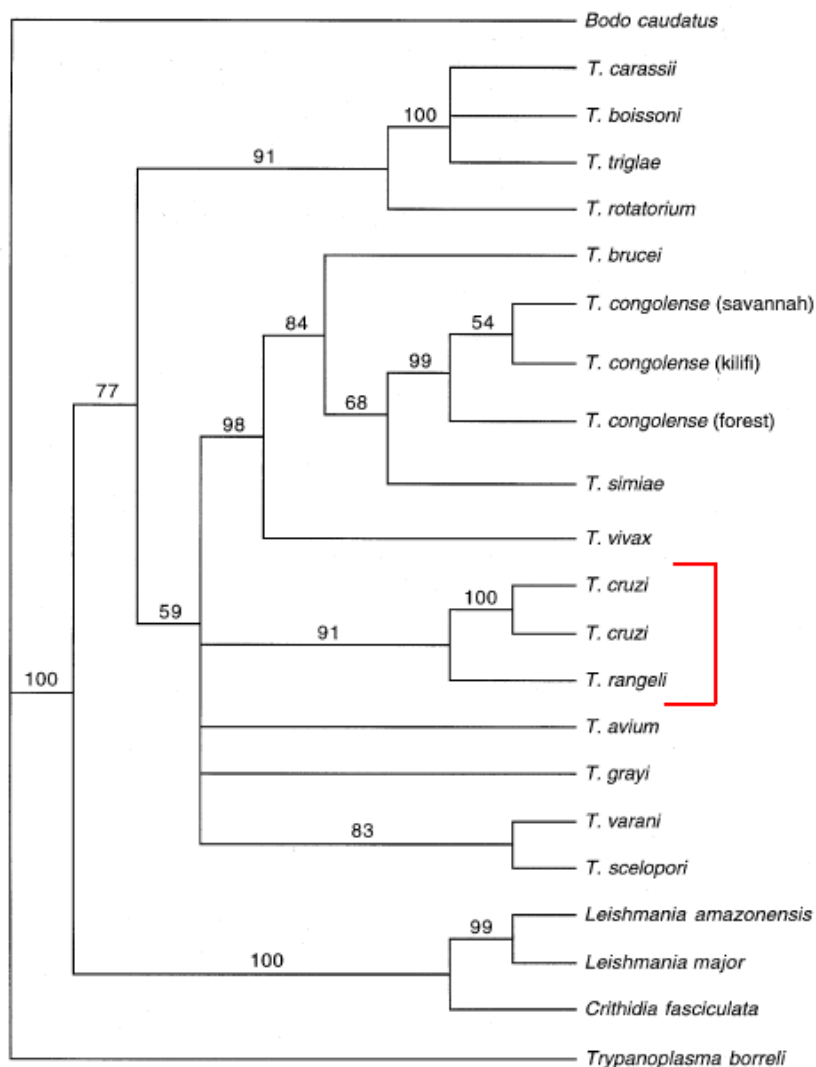
Dominio	Eucariota
Reino	Protozoa (Goldfuss, 1818; R. Owen, 1858)
Subreino	Biciliata
Infrareino	Excavata (Cavalier-Smith, 2002)
Filo	Euglenozoa (Cavalier-Smith, 2002)
Subfilo	Saccostoma (Cavalier-Smith, 2002)
Clase	Kinetoplastea (Honigberg, 1963; L. Margulis, 1974)
Orden	Trypanosomatida (Kent, 1880; Hollande, 1952)
Familia	Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
Género	<i>Trypanosoma</i> (Gruby, 1843)
	<i>Trypanosoma stercoraria</i>
Subgénero	<i>Trypanosoma</i> Shizotrypanum (Chagas, 1909)
Especie	<i>Cruzi</i>

(Brands, 2007)

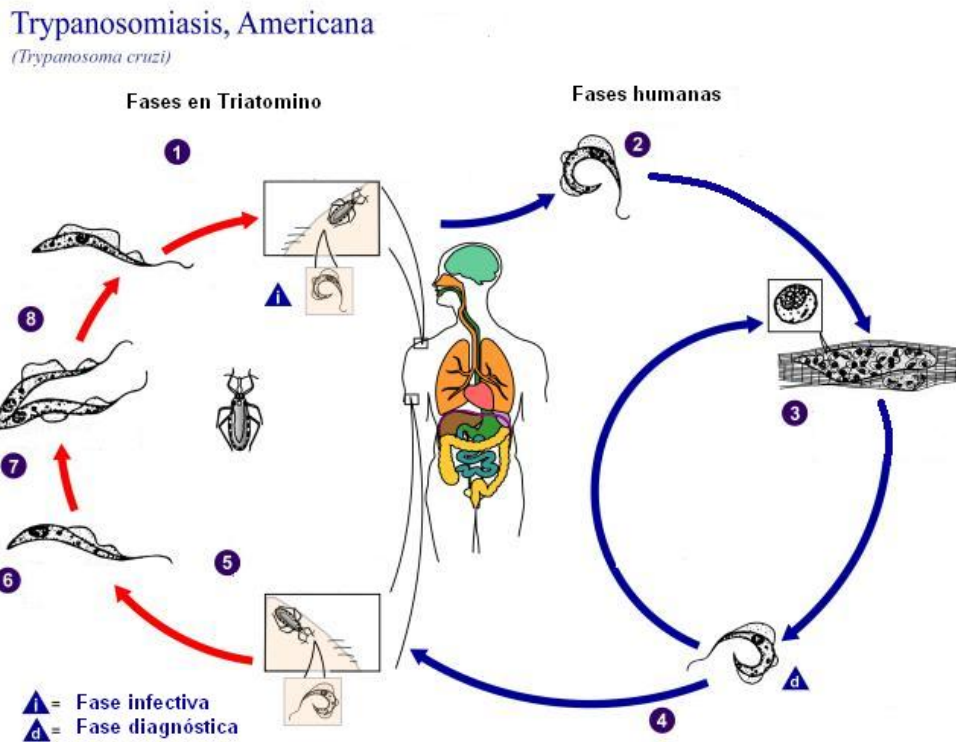
Es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospederos multicelulares, uno invertebrado y uno vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético, hacer referencia a figura 5. El ciclo inicia cuando un triatomino infectado se alimenta de la sangre del hospedero, los tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en las heces entran al cuerpo por la herida o por las membranas mucosas tal como la conjuntiva. Estos tripomastigotes metacíclicos penetran en varias células que están en la herida y adentro se transforman a amastigotes. Los amastigotes se multiplican por fusión binaria en las células de los tejidos infectados. Los amastigotes intracelulares pueden transformarse a tripomastigotes, causar lisis celular y entrar al torrente sanguíneo. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, transformarse en amastigotes y así producir un nuevo sitio de infección. Las manifestaciones clínicas pueden deberse a este ciclo. Otro

triatomino puede infectarse al alimentarse de sangre que contenga tripomastigotes. Los tripomastigotes se transforman a epimastigotes y luego se multiplican en el intestino del vector, siguen todo el trayecto digestivo y en el recto se transforman en trypomastigotes metacíclicos la forma infectiva (CDC, 2003).

Figura 4: árbol filogenético de los kinetoplastos construido a partir de secuencia 18S ribosomal. En rojo se muestra la relación entre *T. cruzi* y *T. rangeli*.



(Adaptado de Shaw *et al*, 1999)

Figura 5: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

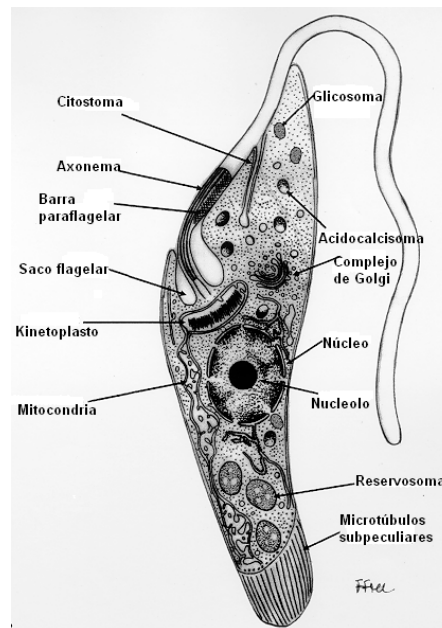
(Adaptado de CDC, 2003)

Los tripanosomas tienen los componentes celulares típicos de los eucariotas: núcleo, microtúbulos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondria, hacer referencia a figura 6. También posee un kinetoplasto que es el componente celular al cual se debe el orden taxonómico (Campbell, 2002).

El kinetoplasto es una condensación de ADN extranuclear que se encuentra cerca de la base del flagelo dentro de la región ocupada por la mitocondria y que tiene forma de bastón. Este ADN conforma el 30% del total y es análogo al ADN mitocondrial encontrado en otros eucariotas (de Souza, 1999). Básicamente está formado por maxicírculos y una red de 20,000 a 30,000 minicírculos altamente asociados, hacer referencia a figura 7, los primeros con un largo de 6 a 11µm y los segundos de 0.45µm que corresponde a 1440 pares de bases (Englund *et al*, 1996). Análisis del minicírculo con enzimas de restricción ha mostrado que son secuencias altamente

heterogéneas, haciendo posible la distinción de cepas o clones dentro de la especie (de Souza, 1999). El ADN del minicírculo codifica a ARN pequeño y tiene como función controlar la especificidad del proceso de edición del ARNm transcrito a partir de los maxicírculos (Hadjuk & Sabatini 1996).

Figura 6: Componentes del celulares de *T. cruzi*



(Adaptado de de Souza, 1999)

Las células de *T. cruzi* pueden tener tres formas definidas: amastigote, epimastigote y tripomastigote. Esta diferenciación se basa en la forma de las células (esférica, periforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral). Se le llama tripomastigote metacíclico al estado infeccioso (Fife 1977), hacer referencia a figura 8.

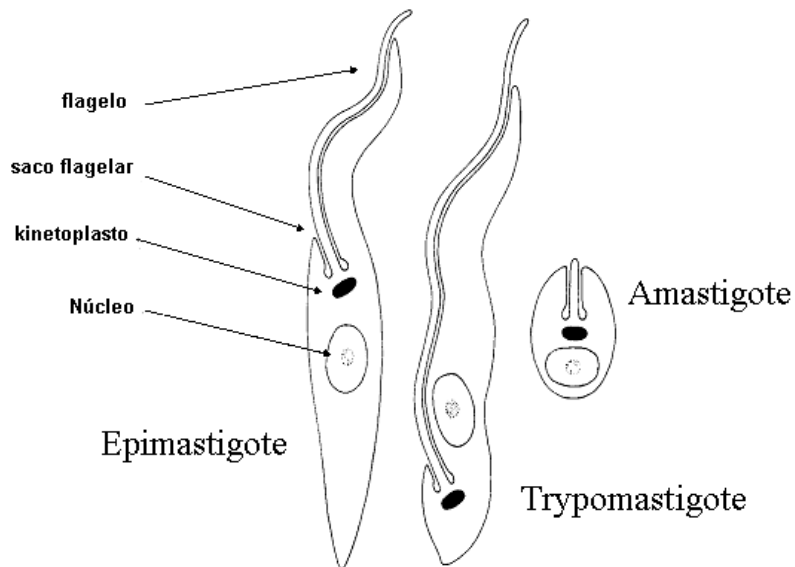
- Epimastigote: (20 - 40 x 2 μm) forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos, constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi* (Rodríguez *et al*, 2004).

Figura 7: Red de minicírculos del kinetoplasto en la base del flagelo emergente en una forma epimastigota.



(Adaptado de de Souza, 1999)

Figura 8: Diferentes morfologías de *Trypanosoma cruzi*



(Adaptado de Simpson Lab, 2007)

- Amastigote: (2 - 4 μm) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero (Rodríguez *et al*, 2004).

- Tripomastigote: (20 x 25 μm) forma elongada con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; está presente en la sangre del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedero vertebrado, carece de capacidad replicativa. (Rodríguez *et al*, 2004)

También se puede encontrar una forma llamada esferomastigote que esta adaptada a condiciones adversas en el estómago del insecto vector o a situaciones experimentales *in vitro*. (Rodríguez *et al*, 2004)

Ciclo de transmisión de *T. cruzi*: La principal vía de transmisión del *Trypanosoma* entre sus hospedadores es la transmisión vectorial (a través del vector) en la cual se pueden distinguir tres ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico. (Rodríguez *et al*, 2004)

Ciclo silvestre: prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno florísticas y disponibilidad de alimentos. En este contexto se encuentra en toda América, albergándose el parásito en mamíferos de medio y pequeño tamaño y en los insectos vectores. (Rodríguez *et al*, 2004)

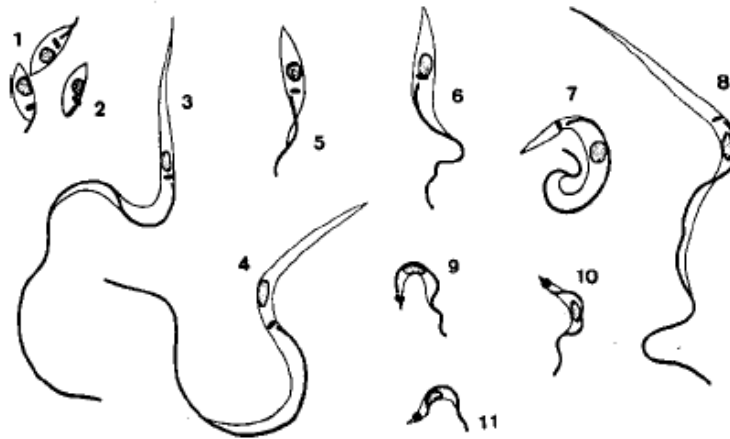
Ciclo doméstico: Se caracteriza en que el hombre es el principal reservorio de la infección. Este ciclo resulta como producto de la tasa de migraciones desde áreas rurales hacia zonas urbanas, acciones sobre el medio natural como quema o deforestación y construcción de viviendas con materiales que pueden prestar abrigo a los vectores. (Rodríguez *et al*, 2004)

Ciclo peridoméstico: en este ciclo intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las domicilios así como los triatomas silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento. Este ciclo sirve de unión a los ciclos silvestre y doméstico. (Rodríguez *et al*, 2004)

2. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920). En América latina éste es el segundo tripanosoma de importancia por su infección en humanos. Este parásito hemoflagelado es perteneciente a la familia Stercoria. En la sangre las formas tripomastigotas son largas y finas con una longitud de 26 a 34µm, incluyendo el flagelo. Posee un kinetoplasto subterminal redondo que es más pequeño que en *T. cruzi*, el núcleo esta cerca de la mitad del cuerpo y la membrana ondulante está bien desarrollada (Guhl & Vallejo, 2003). Tanto en cultivo como en el vector, *T. rangeli* puede ser polimórfico con formas epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas de varios tamaños (de Sousa, 1999), hacer referencia a figura 9. De modo que la distinción morfológica con *T. cruzi* puede llevarse a cabo, hacer referencia a figura 10, pero debido a la variabilidad en el tamaño y a la similar morfología esto no es suficiente para excluir la presencia del otro flagelado en la muestra (Chiurillo *et al*, 2003).

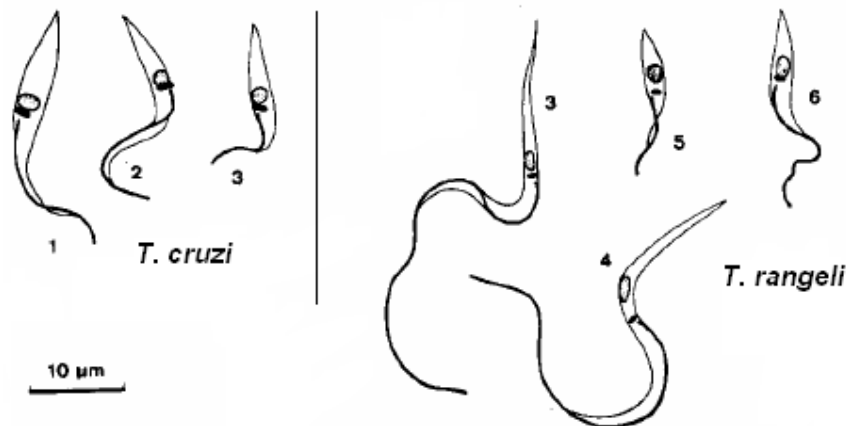
T. rangeli puede infectar a humanos y a una amplia variedad de animales selváticos y domésticos, sin embargo no es patogénico para el hospedero y en humanos la infección acaba sin necesidad de medicamentos en un período de tres años (D'Alessandro, 1992). En algunos casos se pueden presentar infecciones mixtas de *T. cruzi* con *T. rangeli* lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad de Chagas ya que se han encontrado reacciones serológicas cruzadas (Guhl & Marinkelle, 1982). Así mismo, ambos parásitos comparten la región geográfica en la cual están distribuidos, hacer referencia figura 11, y además poseen los mismos reservorios y vectores (Grisard *et al*, 1999).

Figura 9: Morfología de *Trypanosoma rangeli*. 1-10: formas de *T. rangeli* aisladas a partir de cultivo, cepa SC58; 1: epimastigotes pequeños; 2: formas aflageladas pequeñas; 3-6: epimastigotes; 7-8: tripomastigotes; 9-10: tripomastigotes metacíclicos; 11: formas metacíclicas de *T. rangeli* aisladas de glándulas salivales de *R. prolixus* experimentalmente infectado.



(Adaptado de de Sousa, 1999)

Figura 10: Comparación entre formas epimastigotas de *T. cruzi* (20um aproximadamente) y *T. rangeli* (100um aproximadamente).



Se ha observado que los triatomíneos, particularmente los del género *Rhodnius*, son susceptibles a cepas de *T. rangeli* que poseen el mismo origen geográfico (Cuba Cuba *et al*, 1972; Cuba Cuba 1998; D'Alessandro 1976, D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia 1992, Machado *et al*, 2001). Se ha demostrado el desarrollo de *T. rangeli* en las glándulas salivales de *Rhodnius* y

que existe capacidad vectorial a través de la picadura en condiciones naturales o experimentales en 12 de 15 especies de este insecto. La infección natural en las glándulas salivales de *T. dimidiata* solo ha sido reportada en Colombia (Marinkelle 1968), recientes estudios mostraron que la infección experimental en las glándulas salivales ocurría en un 4% y solo después de 40 días (Guhl & Vallejo, 2003).

Figura 11: Traslape entre las distribución de la enfermedad de Chagas (área gris) y los lugares en donde se ha reportado *Trypanosoma rangeli* (diamante).



(Adaptado de Grisard, 1999)

3. Diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante ADN del minicírculo. Se han desarrollado varias pruebas para la detección específica de *T. cruzi* y *T. rangeli*, algunas están basadas en ADN nuclear o del kinetoplástido (González *et al*, 1984; Greig & Ashall, 1987; Ashall *et al*, 1988; Macina *et al*, 1987). Los métodos que usan el ADN del kinetoplástido como blanco parecen ser más sensibles en la detección de la infección por *T. cruzi*: 0.015fg de ADNk minicírculo, aproximadamente 10 moléculas (Sturm *et al*, 1989). De modo que es posible detectar la presencia de una sola célula de *T. cruzi* en 20mL de sangre humana (Avila *et al*, 1991). Se desarrollaron tres pares de cebadores S33A:S34A y S34A:S67 que

amplifican fragmentos de la región constante del minicírculo y S35:S36 que amplifica 330 pb en la región variable. Se ha reportado que los primeros dos juegos presentan productos de ambos *T. cruzi* y *T. rangeli* mientras que el último es específico para *T. cruzi* (Sturm *et al*, 1989; Avila *et al*, 1990, 1991, 1993). No obstante otros investigadores cuando publicaron la secuencia completa del ADNk de *T. rangeli* mostraron que dos regiones conservadas se alinean con las de *T. cruzi* (Vallejo *et al*, 1994; Recinos *et al*, 1994). Sorprendentemente la región conservada resultó ser tal que permite la hibridización de los cebadores S35:S36 con lo que se puede amplificar ADN del minicírculo de *T. rangeli*, hacer referencia a figura 12 (Acceso a GenBank, *T. cruzi*: M18814-M18816, M19174-M19181, M19185-M19192 y *T. rangeli*: L19388-L19395, L28038-L28039), mayúsculas representan un consenso mayor a 60% y minúsculas de 50% (Vallejo *et al*, 1999).

Figura 12: Alineación del ADN del minicírculo de *Trypanosoma cruzi* (T.C) y *Trypanosoma rangeli* (T.R)

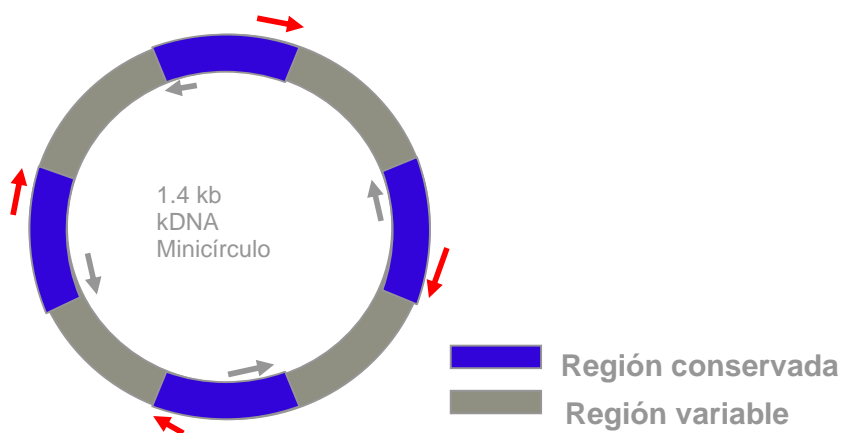
		CSB-1		CSB-2	
T. C 001	atTtcGGAAAtTtTGGTTTGGG	<u>AGGGGCGTTC</u>	AACTTTTGGGGCGaAAATTCATGCATCTC	<u>CCCCGTAC</u>	070
T. R 001	TgTcAGAAAAaTtGGTTTGGG	<u>AGGGGCGTTC</u>	AAGATTGGGGgTCagAATTCATGCATCTC	<u>CCCCGTAC</u>	070
			S35: 3'-	AGTACGTAGAGGGGCATG	
				CSB-3	
T. C 071	ATTATTTtGgCcAAAAAtggGgaTTTTTcacGGGAGGTGGGGTTCGATT	<u>GGGGTTGGTGT</u>	AATATAG		0136
T. R 071	ATTATTTtgCTataAAaTgGTgTTTTTCAGGGAgGTGGAGTTCGATT	<u>GGGGTTGGTGT</u>	AATATAG		0136
	TAATAAA-5'		S36: 5'-	GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	

(Adaptado de Vallejo *et al*, 1999).

Las moléculas de minicírculo de *T. cruzi*, poseen una extensión de 1.4 Kb y están organizadas en cuatro segmentos, cada uno consiste en una región corta de ADN altamente conservado entre *T. cruzi*, además posee una región más larga que exhibe alta variabilidad en la secuencia, hacer referencia a figura 13 (Degraeve *et al*, 1988). Los cebadores para amplificar la región variable se encuentran en la parte conservada alrededor de la misma y generan un producto de 330 pares de bases (Avila *et al*, 1990; Sturm *et al*, 1989). En algunos casos se detecta una banda a 660 o 990 pb que corresponde a múltiplos de la región variable del minicírculo (Avila *et al*, 1993). La alta variabilidad que se observa en la región amplificada se evidencia tanto dentro de cepas como entre las misma y esto permite la clasificación en

esquizodemos (Avila *et al*, 1990; Morel *et al*, 1980). Quizá esto represente clones que ocurren naturalmente los cuales se han aislado genéticamente por largos períodos de tiempo (Tibayrenc *et al*, 1986; 1988; 1990). La presencia de *T. rangeli* es determinada mediante la detección de un fragmento de 760 pb y un juego de bandas entre 300-450 pb, especialmente la banda a 450 (Vallejo *et al*, 1999).

Figura 13: Esquema del ADN de minicirculo de *T. cruzi*. Las flechas muestran la posición de los cebadores S36 y S36.



Ensayos realizados con los cebadores S35:S36 mostraron que la infección simple por *T. cruzi* o *T. rangeli* en hemolinfa, glándula salival o tejido del intestino de *R. prolixus* es fácilmente identificada. Así mismo cuando la amplificación se lleva a cabo usando muestras del intestino medio (grueso y delgado) de *R. prolixus* infectado con ambos parásitos se detectan los dos, no obstante la presencia de *T. rangeli* puede ser enmascarada por la banda de *T. cruzi* si la separación electroforética es ineficiente. Sin embargo al tomar muestra de tejido rectal únicamente se detectó *T. cruzi*, una posible explicación es que los minicirculos son más abundantes en *T. cruzi* que en *T. rangeli* y probablemente estos compiten en la hibridación con los cebadores (Vallejo *et al*, 1999). Además, *T. rangeli* frecuentemente infecta más el intestino medio delgado que el recto, mientras que *T. cruzi* se encuentra normalmente en el recto (D'Alessandro, 1976; Vallejo *et al*, 1988).

D. Variabilidad de *Trypanosoma cruzi*

El parásito *T. cruzi* es considerado como una especie heterogénea que consiste en varias subpoblaciones que circulan entre los vectores y sus reservorios (Revisión por Devera *et al*, 2003). La diversidad genética puede ser el resultado de la propagación de los clones con poco o ausente intercambio genético (Souto *et al*, 1996). De tal forma que, el mismo hospedero podría estar simultáneamente infectado por cepas diferentes. Las cepas se clasifican como clones que se distribuyen en áreas geográficas específicas (Tybarenc & Brenière, 1988; Lauria-Pires *et al*, 1996; 1977; Lauria-Pires & Teixeira, 1996; Andrade & Campos, 1998; Andrade 1999).

Entre las formas de clasificación de las cepas de *T. cruzi* se encuentra la realizada por Souto *et al*, 1996. Basándose en los genes del ADNr y el miniexón se indicó un claro dimorfismo del taxón que definió el grupo *T. cruzi* I y *T. cruzi* II; esta será la nomenclatura que se usará en este trabajo.

1. Comportamiento biológico. Estudios previos han investigado el comportamiento biológico en animales de laboratorio especialmente los de la familia Muridae para caracterizar las cepas de *T. cruzi* (Devera *et al*, 2003). En estos experimentos se ha observado que la susceptibilidad y la sobrevivencia dependen tanto de la cepa de parásito como de la línea de ratón. Se demostró que las cepas aisladas de reservorios humanos y de vectores en áreas geográficas diferentes muestran un comportamiento distinto en los animales de laboratorio, esto se refiere a parasitemia, tropismo por tejido y mortalidad. Este fenómeno también se ve influenciado por el ambiente y factores inmunogénicos. Además se ha observado la selección de clones después de interactuar con los vectores y hospederos. (Revisión por Devera *et al*, 2003).

El primer intento de agrupar las cepas de *T. cruzi*, se basó en criterios morfo-biológicos. Chagas (1909) observó la presencia de parásitos circulantes de forma ancha y angosta. Esto se confirmó al demostrar que estas formas

circulan en diferente proporción, las formas angostas son predominantes en cepas con extrema virulencia, tropismo por macrófagos y son susceptibles al sistema inmune, mientras que las anchas son miotrópicas y tienen poca virulencia. Fue así como se dio origen a las cepas Y y CL respectivamente (Revisión por Devera *et al*, 2003).

Por otro lado, el uso de parámetros biológicos acerca de la interacción parásito-ratón dio lugar a tres subgrupos llamados biodemos. Estos se caracterizan por diferentes parasitemias, morfologías, tropismo por tejidos y lesiones histopatológicas (Andrade, 1974). El biodemo I análogo a Y consiste en parasitemias altas, crecimiento rápido y mortalidad, la cual ocurre entre el día 7 y 12 después de la infección. El biodemo II identificado como el de San Felipe se multiplica lentamente llegando al pico máximo entre el día 12 y 20 después de la infección, intervalo que corresponde también a la mortalidad. Al inicio se ven formas anchas y pocas angostas así como miotropismo. Finalmente, el biodemo III se multiplica lentamente presentando picos entre el día 20 y 30 después de la infección, la mortalidad es baja y ocurre alrededor del día 50. Las formas anchas son comunes y dañan el tejido esquelético (Andrade *et al*, 1983, Andrade & Magalhães 1997).

Existe una hipótesis que sugiere que la heterogeneidad y multiclonalidad de la cepa determina un tropismo por un tejido específico y como consecuencia hay variación en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Andrade 1999). A esta idea se le ha llamado el modelo clonal histotrópico (Macedo *et al*, 1992, Oliveira *et al*, 1998, 1999, Macedo & Pena 1998). Hay evidencia experimental que muestra que los clones aislados de tejido cardíaco son diferentes de los obtenidos del esófago de algunos pacientes (Andrade, 1999). Esto significa que los diferentes genotipos presentan una distribución favoritaria en tejidos de pacientes crónicos sugiriendo que la variabilidad genética influye en la forma clínica (Vago *et al*, 2000). Algunas cepas prefieren tejido muscular (esquelético o cardíaco) y son llamadas miotrópicas, a otras en cambio se les dice reticulotrópicas puesto que prefieren células mononucleares fagocíticas y hay un tercer grupo que

prefiere otros tejidos como nervioso o reproductivo (Revisión por Devera *et al*, 2003).

Las poblaciones de *T. cruzi* son complejas y heterogéneas pero el cultivo *in vitro*, la inoculación en animales de laboratorio o su paso por triatomíneos pueden seleccionar ciertas subpoblaciones de la muestra original. Estos filtros pueden seleccionar a aquellas poblaciones o clones que más se adapten al nuevo ambiente. En el caso del cultivo, la selección puede modificarse si cambian los nutrientes del medio. El sistema inmune de los reservorios vertebrados juega un papel importante en este fenómeno (Revisión por Devera *et al*, 2003).

a. Infección de animales. Cuando se mantiene por un largo tiempo a *T. cruzi* en animales de laboratorio se encuentran alteraciones en las características biológicas de la cepa original. Por ejemplo la virulencia se ha visto disminuida (Araújo, 2000) y en otros casos intensificada (Carneiro *et al*, 1991). También es común que se reporte cambios en los patrones isoenzimáticos, RFLP o ADNk después de inocular en animales (Revisión por Devera *et al*, 2003).

b. Cultivo *in Vitro*. El cultivo por amplios períodos de tiempo conlleva a la disminución de la virulencia y la falta de infectividad de la cepa en animales de laboratorio. Este fenómeno se ha explicado mediante la selección de subpoblaciones que están mejor adaptadas al medio de cultivo. Algunas poblaciones pueden desarrollarse mejor que otras en sistemas *in vitro* lo que resulta en la modificación del patrón genético original. Los clones que tienen un período de duplicación menor pueden ser seleccionados por cultivo al compararse con los de un período mayor. El cultivo conlleva alteraciones determinantes en el fenotipo, disminución de la infectividad, virulencia y cambios en el patrón electroforético de enzimas; así como modificaciones genotípicas por ejemplo en el patrón de RFLP y ADNk. Se le llama transkinetoplástido cuando se observan cambios rápidos en el ADNk minicírculo lo que lleva a patrones de restricción diferentes. Probablemente

los componentes del medio de cultivo interfieren con la transcripción de ciertos genes, regulando las actividades esenciales del kinetoplasto, lo cual puede influir en una mitosis apropiada (Revisión por Devera *et al*, 2003).

En Guatemala, en un estudio preliminar, se cultivó en LIT contenido intestinal de vectores domésticos. Aunque se usaron procedimientos iguales, aproximadamente se obtuvo el 88% de éxito a partir de *T. dimidiata* (63/72) y 47% de *R. prolixus* (20/43). Lo que sugiere que los aislados de *T. dimidiata* están significativamente más adaptados al crecimiento en LIT que los aislados de *R. prolixus* posiblemente porque hay diferencias biológicas intrínsecas entre las subpoblaciones que infectan cada vector (Comunicado personal, Pennigton, 2003).

c. Infección en humanos: Las cepas de *T. cruzi* aisladas a partir de diferentes triatomíneos y hospederos vertebrados han mostrado ser poblaciones multiclonales. En un paciente crónico estas poblaciones pueden ser seleccionadas durante la interacción parásito-humano y el tropismo por tejido puede interferir con la distribución de las mismas. Esto justifica que los aislados de pacientes crónicos son comúnmente poblaciones homogéneas comparadas con los de pacientes en fase aguda o de componentes del ciclo selvático. No se ha encontrado una correlación entre la variabilidad genética del parásito y las características clínicas. Probablemente se podrá predecir si la enfermedad será asintomática, presentar daños cardíacos o digestivos hasta que se caracterice completamente a *T. cruzi* y se conozca la relación humano-parásito a profundidad (Revisión por Devera *et al*, 2003).

2. Análisis evolutivo. En ausencia de fósiles de tripanosomátidos, la única forma de estimar los tiempo de divergencia se basa en el análisis de datos moleculares (Kawashita *et al*, 2001).

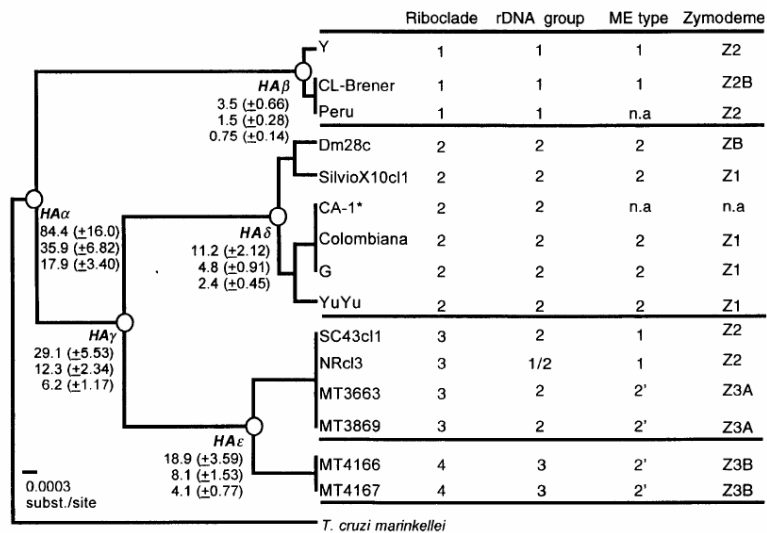
a. Teoría evolutiva de Kawashita *et al*, 2001. Kawashita *et al*, 2001, realizó un análisis filogenético (“maximun likelihood”) de 20 cepas representativas de *T. cruzi* basándose en comparaciones directas de las

secuencias de 18S y D7-24Sa ADNr, con lo cual se confirmó una subdivisión primaria en dos linajes: riboclado 1 y riboclado 2, 3 y 4; hacer referencia a figura 14 (Souto *et al*, 1996; Stothard *et al*, 1998; Fernandes *et al*, 1998a). El riboclado 1 corresponde a *T. cruzi* II y se encontró principalmente en el ciclo doméstico y en pacientes. Por su lado, *T. cruzi* I (riboclado 2) y Z3 (riboclado 4) se ha asociado con el ciclo selvático aislándose de zarigüeyas, roedores salvajes y triatominos (Miles & Cibulskis 1986; Zingales *et al*, 1998; Fernandes *et al*, 2001). Posiblemente la variabilidad encontrada entre los ribocladados 2, 3 y 4 se explica con la evolución y la distribución específica de sus hospederos y vectores que evolucionaron en Sur América durante el Cenozoico (Marcilla *et al*, 2001). El grupo ½ de Souto *et al*, 1996 pertenece al riboclado 3 y quizá se originó por una transferencia eventual de ADNr del grupo 2 al 1, ya sea por reproducción o por transferencia horizontal de genes. Otros análisis sugieren que existen otros genes que pudieron ser transferidos de la misma forma, además, los estudios que hablan de la formación de organismos híbridos apoyan esta hipótesis (Carrasco *et al*, 1996; Bogliolo *et al*, 1996; Stohard *et al*, 1999).

El ancestro hipotético de los ribocladados 1, 2, 3 y 4 se esparció en todo sur y norte América hace 84.4 millones de años atrás cuando Sur América y África aún estaba unidos, hacer referencia a figura 15. Cuando estos continentes se separaron, en el período Cenozoico, la fauna de Sur América estaba compuesta por marsupiales, endentados y ungulados. Se propone que los ribocladados 2, 3 y 4 evolucionaron de los marsupiales sur americanos que estaban aislados de los placentales de Norte América infectados con el riboclado 1, esto posiblemente ocurrió en el período cenozoico. De acuerdo con esta hipótesis, el riboclado 1 puede haber llegado a Sur América durante el oligoceno junto con los roedores y los primates que migraban de isla en isla, o durante el gran intercambio de fauna que ocurrió durante el plioceno-pleistoceno cuando Sur y Norte América se conectaron mediante el istmo de Panamá (Kawashita *et al*, 2001). En Norte América la asociación entre riboclado 1 y mamíferos placentales y por otro lado riboclado 2 y marsupiales es fuerte y puede ser evidencia de la evolución independiente de estos clados

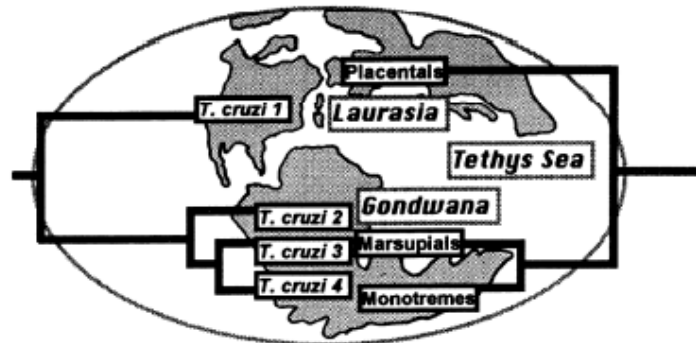
por un largo período de tiempo (Clark *et al*, 1994). De modo que la divergencia entre *T. cruzi* I y II posiblemente ocurrió en el período cretácico (144-65 millones de años atrás) y los subclados divergieron en el período terciario de la era cenozoica (65 a 1.8 millones de años atrás) (Kawashita *et al*, 2001).

Figura 14: Tiempos estimados de divergencia para los ribocladados de *Trypanosoma cruzi* y su correlación con grupos definidos mediante otros métodos.



(Adaptado de Kawashita *et al*, 2001)

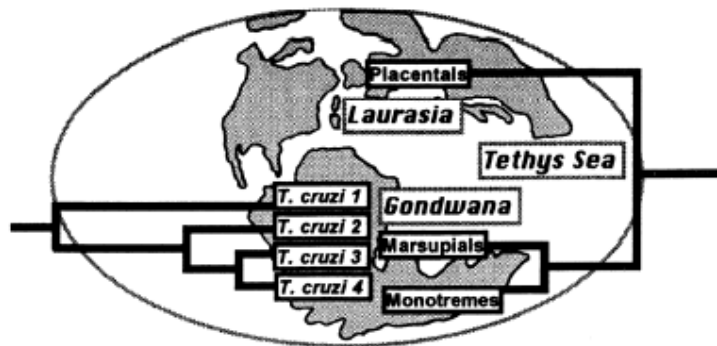
Figura 15: Especiación de *T. cruzi* basada en la separación geográfica de las américas y su asociación ecológica con diferentes reservorios.



(Adaptado de Kawashita *et al*, 2001)

Otra alternativa es asumir una razón de evolución más alta (4% de divergencia por 100 millones de años) para la secuencia de ADNr 18S en *T. cruzi*. Esto sugeriría que la divergencia de las cepas ocurrió recientemente, menos de 18 millones de años y que puede ser el resultado de la coespeciación con los vectores o las barreras geográficas en Sur América que aislaron a los marsupiales de los mamíferos placentales (Kawashita *et al*, 2001), hacer referencia a figura 16.

Figura 16: Especiación de *T. cruzi* basada en alguna separación geográfica de América del Sur o su asociación ecológica con diferentes vectores.



(Adaptado de Kawashita *et al*, 2001)

b. Teoría evolutiva de Gaunt & Miles, 2000. Observaciones en el amazonas brasileño han proveído evidencia de que muchas especies de triatomíneos están adaptados a sus ecótopos naturales, lo que implica una larga evolución histórica así como la expansión reciente de las especie domiciliarias (Miles *et al*, 1981 a y b; Gaunt & Miles, 2000). La distribución geográfica actual puede deberse en parte por la contracción y expansión de los bosques que se ha dado como consecuencia de los cambios climáticos (Gaunt & Miles, 2000).

Virtualmente, todas las especies de *Rhodnius* están asociadas principalmente con árboles de palma (Lent & Wygodzinsky 1979, Miles 1979, Carcavallo *et al*, 1998), lo que podría deberse a una historia evolutiva común (Gaunt & Miles, 2000). La adaptación de *Rhodnius* a las palmas puede evidenciarse por la coloración, los órganos escaladores y en que la distribución de estos dos

grupos coincide notablemente. Además muchas especies de este género se alimentan de pájaros que comúnmente viven en estas plantas. Una investigación que asocia a las especies de *Triatoma* con su hábitat (Miles 1979), revela que al menos 20 especies están asociadas con cavernas o madrigueras de roedores. La preferencia de un género por su hábitat influencia la distribución dentro de las casas, por ejemplo, *R. prolixus* se encuentra en techos de palma.

Se ha observado que *T. cruzi* I y *T. rangeli* han sido consistentemente aislado a partir de zarigüeyas (marsupiales del género *Didelphis*), que se encuentran infectando especies de *Rhodnius* (Pova *et al*, 1984, Carrasco *et al*, 1996) y que la distribución geográfica de parásitos, reservorios e insectos coincide. La diferencia principal es que *T. cruzi* I se transmite por contaminación fecal mientras que *T. rangeli* por saliva. Por su lado, *T. cruzi* II predomina en el ciclo de transmisión doméstica en países de Sur América (Miles *et al*, 1984, Chapman *et al*, 1984), mientras que *T. cruzi* I en los ciclos de transmisión del norte del amazonas.

Se sugiere que *T. infestans* se esparció desde su hábitat selvático en las rocas de Bolivia hasta la región doméstica de las naciones del cono sur. Esto lleva a hipotetizar que hay una asociación entre *T. cruzi* II, *Triatoma* y roedores (Gaunt & Miles, 2000). Además, en el sur de Brazil se le ha asociado con primates (Fernandes *et al*, 1999). En el cuadro 2 se sintetizan estas asociaciones las cuales sugieren un patrón de evolución (Gaunt & Miles, 2000), no obstante pueden existir excepciones (Valente *et al*, 1998).

Los primeros mamíferos de Sur América, hace 65 millones de años fueron marsupiales y mamíferos endentados (armadillos, perezosos y osos hormigueros) que migraron de Norte América. La evidencia fósil indica que los roedores, primates y murciélagos llegaron 25 millones de años después desde África. Si *T. cruzi* II está asociado con roedores o primates, esto indica que su historia evolutiva es más reciente que la de *T. cruzi* I (Gaunt & Miles, 2000).

Cuadro 2: Diferencias entre el género *Rhodnius* y *Triatoma*

	<i>Rhodnius</i>	<i>Triatoma</i>
Ecótopo silvestre	Arboreal: palmas	Terrestre: rocas
Tripanosomas asociados	<i>T. cruzi</i> I y <i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i> II
Hospederos asociados	Marsupiales	Roedores y primates

(Adaptado de Gaunt & Miles, 2000)

Basado en estas observaciones se propone que *T. cruzi* I evolucionó en palmas con especies Rhodniini y en asociación con zarigüeyas (*Didelphis*). Mientras que, *T. cruzi* II y Z3 evolucionaron de hábitats y madrigueras terrestres en lugares rocosos con los insectos Triatomini y en asociación con endentados y posiblemente marsupiales. Así, los endentados son el hospedero primario de *T. cruzi* II y Z3 y las subdivisiones pudieron ser contemporáneas en Sur América desde hace 65 millones de años. *T. cruzi* II llegó a los roedores más tarde a través de los ecótopos terrestres compartidos con endentados. Una hipótesis alterna es que no hubo asociación temprana entre *T. cruzi* II y los endentados, por lo tanto estas poblaciones divergieron recientemente a partir de *T. cruzi* I mediante la transferencia del hospedero hacia roedores, endentados y primates (Gaunt & Miles, 2000).

La existencia de *T. cruzi* metacíclico en glándulas de marsupiales ha sugerido que su transmisión en algún momento fue de marsupial a marsupial. En este caso los insectos triatomini adquirieron la infección hasta que *T. cruzi* evolucionó a parásito sanguíneo. Otra opción es que evolucionó de flagelados que viven en insectos, esta idea se fortalece con el hecho que algunos kinetoplástidos viven en insectos y no tienen un hospedero vertebrado (Gaunt & Miles, 2000).

3. Características bioquímicas. Se han utilizado diferentes técnicas bioquímicas para estudiar la variabilidad de *T. cruzi*. Están técnicas

se enfocan al nivel de proteínas, sin embargo son reflejo de la variabilidad genética.

a. Electroforesis enzimática: La electroforesis enzimática utiliza extractos de organismos para aislar las proteínas y luego evaluar la actividad enzimática incubando con un sustrato. Bajo condiciones controladas estas diferencias se reflejan en el nivel genético. Se realizaron varios estudios de este tipo con muestras de Brasil evaluando las enzimas ALAT, ASAT, isomerasa glucofosfato (GPI), glucosa 6 fosfato dehidrogenasa (G6PDH), enzima málica (ME) y fosfoglucomutasa (PGM); de estos resultado se obtuvieron los zimodemos 1 y 2 (Miles *et al*, 1977; 1978; 1980; 1981a; 1981b). El zimodemo 1 agrupa a los marsupiales y los triatomos salvajes, el Z2 son domésticos y se derivan de humanos y mamíferos domiciliarios. Estudios adicionales mostraron un tercer zimodemo asociado a ambientes selváticos. Tiempo después el estudio se amplió a 8 enzimas ALAT, ASAT, ME, PGM, G6PD, GPI, 6- fosfato dehidrogenasa (6PGD) y malato dehidrogenasa (MDH); Con esto se clasifico en ZA, ZB, ZC y ZD (Romanha, 1982; Carneiro *et al*, 1990). El análisis de isoenzimas ha sido el blanco de varias investigaciones por diferentes grupos, obteniéndose resultados no coherentes a los descritos. De modo que se ha concluido que esta técnica no siempre es estable y, aunque que se usen clones, los resultados puede ser discordantes (Revisión por Devera *et al*, 2003).

4. Características moleculares

a. Análisis de esquizodemos: Los esquizodemos se refieren a grupos de parásitos que presentan el mismo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del ADN del kinetoplástido. Esta técnica se basa en la separación electroforética de fragmentos de restricción del ADNk. Ha sido ampliamente utilizada por varios grupos de investigadores. Para la extracción del ADN, se requiere un cultivo previo de parásitos lo que eventualmente podría llevar a la selección de clones a partir de la mezcla original. Se ha considerado como un marcador estable, no obstante la alta heterogeneidad

de algunas cepas ha llevado a la observación de diferentes resultados cuando estas cepas se mantienen en animales de laboratorio o en cultivo (Revisión por Devera *et al*, 2003).

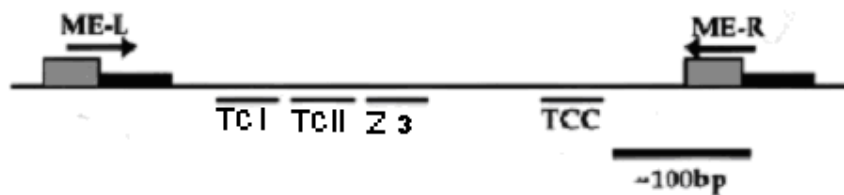
b. Análisis RAPD. Esta técnica, Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) utiliza cebadores cortos de secuencias aleatorias que amplifican fragmentos desconocidos de ADN blanco, esto genera múltiples patrones de bandas que pueden ser específicos para una especie o cepa. Posee la ventaja que se requiere una mínima cantidad de ADN, utiliza un número ilimitado de cebadores y no requiere conocimiento previo de la secuencia. Cuando se aplica este análisis a *T. cruzi* se genera un patrón de bandas complejo pero que da lugar a la subdivisión del parásito en dos grandes grupos. Estos subgrupos corresponden a linajes filogenéticos que coinciden con *T. cruzi* I y II (Revisión por Devera *et al*, 2003).

c. Análisis RFLP-ITS ADNr. Los genes de ARN ribosomal están altamente conservados por lo que tienen un potencial para el análisis filogenético. En los tripanosomas este ADNr se encuentra repetido varias veces, además, las secuencias codificantes de las subunidades grande y pequeña están separadas por espaciadores internos transcritos (ITS por sus siglas en inglés). Los ITS presentan secuencias de alta variabilidad flanqueadas por regiones conservadas, de modo que es posible diseñar cebadores que se hibridicen con estas regiones. Este método se probó antes en especies de *Leishmania* (Cupolillo *et al*, 1995) y luego se adaptó para la caracterización de *T. cruzi* (Fernandes *et al*, 1999b). En estos estudios se confirmó la división del taxón en dos grupos principales *T. cruzi* I y II y permitió agrupar geográficamente a *T. cruzi* II (Revisión por Devera *et al*, 2003).

d. Análisis del miniexón. El ADN nuclear presenta muchas oportunidades disponibles para la caracterización de *T. cruzi*. El gen del miniexón está presente en el genoma nuclear de los organismos del orden Kinetoplástida en casi 200 copias repetidas en tandem, las cuales consisten en tres diferentes regiones: exón, intrón y región intergénica. El exón es una

secuencia de 39 pares de bases, altamente conservada dentro del orden y que es agregada post transcripcionalmente en todos los ARNm. El intrón, por su parte, es moderadamente conservado entre el género o subgénero mientras que la región intergénica, también llamado espaciador no transcrito (NTS-ME) es particularmente diferente entre especies (Devera *et al*, 2003). El espacio intergénico puede ser amplificado con PCR haciendo posible la clasificación de *T. cruzi* en dos grupos taxonómicos principales I y II (Fernández, 1996; Souto *et al*, 1996; Fernandes *et al*, 1998). Hacer referencia a figura 17 en donde se muestra la estrategia de amplificación y la localización de sondas específicas, los cebadores ME-L y ME-R reconocen secuencias del exón (cuadro gris), el intrón se localiza en el cuadro negro y finalmente la línea que conecta representa el espaciador no transcrito y variable. En Sur América, *T. cruzi* I se observa principalmente en animales y triatomos salvajes, mientras que *T. cruzi* II está en humanos (Fernandes *et al*, 1998, Zingales *et al*, 1998). Sin embargo se reveló la presencia de ambos grupos en el ciclo selvático del parásito y su asociación preferencial de las líneas filogenéticas con diferentes hospederos, ilustrando la complejidad del parásito en su ciclo natural (Fernandes *et al*, 1999a).

Figura 17: Esquema de la estrategia de amplificación del gen miniexón y localización de sondas específicas para determinar el grupo al que pertenece.



(Adaptado de Fernandes *et al*, 1998)

Estos subgrupos también pueden relacionarse con los zimodemos propuestos mediante electroforesis enzimática, *T. cruzi* I corresponde al zimodemo 1 y *T. cruzi* II al zimodemo 2. Sin embargo, la posición del zimodemo 3 no está clara. Se secuenciaron algunos aislados del Amazonas que no pudieron ser clasificados con I o II y se encontró que todos los clones

poseían una inserción similar en el espacio no transcrito del gen. Además, dos aislados que se habían caracterizado previamente como Z3 mostraron la misma inserción (Fernandes, 2001). La amplificación del ADN_r y el miniexón también demostraron la presencia de este tercer grupo denominado ½, y filogenéticamente se sugirió que se encuentra más asociado a *T. cruzi* I (Souto *et al*, 1996)

Previamente, se tamizaron cultivos de *T. cruzi* aislados de triatominos encontrados en Guatemala (Comunicación personal, Alejandra Krische, 2005). Los resultados muestran que la mayor parte de las muestras que amplifican pertenecen a TCI. Lo que sugiere que TCI es predominante en la región. Sin embargo es importante notar que una gran cantidad de cultivos no amplificaron (51/74) por lo que se debe ampliar los conocimientos al respecto para obtener una conclusión. Hacer referencia a cuadro 3.

Cuadro 3: Tamizaje de amplificación del mini-exón con TC1, TC2 y TC en muestras de *T. cruzi* cultivadas de triatominos durante la encuesta entomológica basal en Guatemala

TC	<i>T. dimidiata</i>		<i>R. prolixus</i>		Ambas especies	
	# M	% M	# M	% M	# M	% M
2	1	1	0	0	1	1
1	18	26	2	33	20	27
1 y 2	2	3	0	0	2	3
No amplificó	47	69	4	67	51	69
Total	68	100	6	100	74	100

M = número de muestras tamizadas, % M = porcentaje de muestras.

e. Análisis con microsatélites. Este estudio involucra el uso de microsatélites como marcadores moleculares para la caracterización genética de *T. cruzi*, por esta razón este tipo de ADN variable será definido a continuación, luego se continuará con la discusión acerca del uso de estos en estudios de *T. cruzi*.

E. ADN altamente repetitivo

Este tipo de ADN consiste en unidades de nucleótidos que se repiten en tandem, se usan como marcadores genéticos puesto que el número de repeticiones en un locus dado puede variar de un individuo a otro. Según el tamaño de la unidad y la cantidad de veces en que se repite, este ADN se ha dividido en tres clases conocidas como satélites, minisatélites y microsatélites (Bennett 2000). No existe uniformidad respecto a los límites que diferencian estas categorías, no obstante los criterios generales pueden observarse en la cuadro 4.

Cuadro 4: Clasificación de las secuencias de ADN repetidas en tandem

	Satélites	Minisatélites		Microsatélites
		Telomérico	hipervariable	
Tamaño de la unidad (bp)	5-10 ²	10	6-50	1-5
Tamaño total (bp)	100*10 ³ - 10 ⁶	10*10 ³ - 15*10 ³	10 ² - 20*10 ³	10 - 10 ²

(Adaptado de Bennett, 2000)

1. Satélites. Los satélites fueron los primeros en ser descubiertos, se les llamó así debido a que cuando se somete el ADN total a una centrifugación por gradiente de densidad, este ADN aparece como una banda aislada del ADN genómico. Más adelante, sus secuencias fueron identificadas por digestión con enzimas de restricción que cortan únicamente una vez dentro de la unidad de repetición, de modo que la cantidad de monómeros pueden visualizarse mediante una separación electroforética (Bennett, 2000).

La unidad básica de repetición de un satélite puede variar desde 5 hasta varios cientos de bases, además, el número de repeticiones en cada locus es enorme ya que puede estar alrededor de 100kb o varios Mb (hacer referencia a cuadro 4). Por esta razón y debido a que su localización es

restringida, este ADN no se usa para estudios de linaje genético (genetic linkage) ni de identificación de individuos (Bennett, 2000).

2. Minisatélites. Este ADN consiste en un arreglo de repeticiones con un largo aproximado de 100 bp a 20kb (hacer referencia a cuadro 3). Puede ser subdividido en dos tipos conocidos como secuencias teloméricas y secuencias hipervariables. Las primeras, son agregadas a los cromosomas por la enzima telomerasa y tienen la función de proteger contra la degradación y promover la replicación completa de los extremos. Además se sugiere que juegan un papel en el apareamiento y orientación de los cromosomas durante la división celular. Por otra parte, el segundo tipo de minisatélites son unidades de repetición que varían entre 6 a 50 nucleótidos y que poseen un número de repeticiones altamente polimórfico entre diferentes individuos, por esta razón, pueden ser muy útiles como herramienta en la caracterización de sujetos. A este grupo también se le conoce como “repeticiones tandem de número variable” (VNTR por sus siglas en inglés) sin embargo, si se apega a la definición, el término podría incluir tanto satélites como microsátélites (Bennett, 2000).

3. Microsatélites. Los microsátélites también son llamados “repeticiones en tandem cortas” (STRs por sus siglas en inglés), consisten en repeticiones de mononucleótidos o hasta pentanucleótidos y varían desde decenas hasta cientos de bases de largo. Se pueden organizar en una forma simple que consiste en varias repeticiones de dos o más nucleótidos, o pueden poseer una estructura más compleja: dos o más motivos repetidos, $(CA)_n(GT)_n$, o $(dC-dA)_n(dG-dT)_n$. Se les denominan imperfectos o complejos cuando tienen espaciadores entre motivos repetidos varias veces, $(GA)_n(N)_n(CT)_n$ (Chambers, 2000). El número de copias de la unidad de repetición en un locus específico es extremadamente polimórfico y la variación del número de repeticiones puede ocurrir entre alelos. La tasa de mutación varía entre 10^{-6} a 10^{-2} (Harr *et al*, 2000). Esta tasa cambia de acuerdo al número de repeticiones en el arreglo (Bachtrog *et al*, 2000, Xu *et al*, 2000).

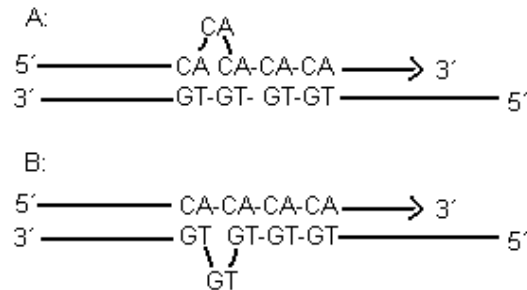
Los microsatélites están presentes a través de todo el genoma tanto en organismos eucariota como en procariota, no obstante su localización específica varía según la especie y el cromosoma. Comúnmente se encuentran en regiones codificadoras flanqueadas por secuencias altamente conservadas (Chambers *et al*, 2000; Morgante *et al*, 2002). No obstante, según Metzgar *et al*, 2000, los tri y hexanucleótidos está presentes en regiones transcritas y no transcritas pero los otros tipos de repeticiones son menos frecuentes en regiones codificadoras. Estos resultados sugieren que la diferencia ocurre por la selección específica ante mutaciones en la fase de lectura que se da cuando hay un cambio de longitud en repeticiones que no son múltiplos de tres (Morgante *et al*, 2002).

Estas secuencias están dispersas de modo que el tamaño de la unidad es inversamente proporcional al número de repeticiones. Es probable que las repeticiones más largas sean menos comunes respondiendo a la forma en que estas se producen, hacer referencia a figura 18. Al proceso de replicación se le llama deslizamiento de ADN, deslizamiento de la polimerasa o deslizamiento de hebra, en esencia, ocurre como consecuencia de un desapareamiento (por una unidad de repetición u ocasionalmente por más) entre el templado original y la nueva hebra. La región resultante de ADN sin aparear se refuerza por la formación de una estructura en forma de anillo. Si esta estructura se encuentra en la nueva hebra, el efecto neto es la adición de una repetición; en cambio, si está en la hebra templado, la estructura es removida por enzimas reparadoras y se obtiene una repetición menos (Bennett, 2000).

Los microsatélites que posean unidades de repetición de varios nucleótidos, necesitan que las hebras recorran más bases para poder aparearse con la siguiente unidad; así se explica porqué son menos comunes y a la vez más estables (Bennett, 2000). Otros factores tal como el número, localización y secuencia de las repeticiones pueden afectar la razón y dirección en la que se da este corrimiento, no obstante, no se han encontrado reglas para esto (Debrauwere *et al*, 1997; Schlötterer, 1998). No obstante,

entre más larga se hace la secuencia, aparece una tendencia a la pérdida de múltiples repeticiones, esto provee un control biológico para el crecimiento ilimitado (Wierdl, 1997).

Figura 18: Deslizamiento de hebra durante la replicación del ADN repetitivo.
 A: el deslizamiento ocurre en la nueva hebra, obteniéndose una inserción; B: el deslizamiento ocurre en la hebra templado, se elimina una repetición.



(Adaptado de Bennett, 2000)

Se debe aclarar que aunque ocurra un deslizamiento en la replicación, este hecho no necesariamente conllevará a la mutación (agregar o eliminar repeticiones) del microsatélite. La mayoría de estructuras en forma de anillo que se producen son corregidas por el sistema de reparación enzimático. Consecuentemente, la razón de mutación de los microsatélites representa el resultado neto del equilibrio entre el deslizamiento y la corrección de errores (Schlötterer, 1998). Esta es una característica que los hace adecuados como marcadores moleculares, puesto que si la razón de mutación fuera muy baja, la ocurrencia de microsatélites sería rara y sus alelos menos polimórficos; si en cambio, fuera muy alta, se observarían cambios entre una generación y otra lo que limitaría el estudio de patrones de herencia y haría menos precisa la caracterización de individuos (Bennett, 2000).

a. Microsatélites como marcadores moleculares. Los microsatélites han reemplazado a los minisatélites como marcadores genéticos en estudios de poblaciones puesto que son abundantes, se heredan mediante codominancia, son altamente polimórficos y además se distribuyen a través de toda la eucromatina (Bennett, 2000). Además, gracias a su tamaño son

versátiles en su manipulación en el laboratorio; se pueden elaborar cebadores de las regiones flanqueantes conservadas, ser amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y luego separados en medio de alta resolución, como lo es la acrilamida, en donde la diferencia de una repetición puede ser resuelta sin ambigüedad.

Por otro lado, se han desarrollado tecnologías que ayudan en el análisis electroforético de los alelos de cada muestra. Actualmente el PCR se lleva a cabo con cebadores marcados covalentemente con fluorescencia lo cual permite que los amplicones puedan ser identificados. La separación se hace bajo el principio de la electroforesis haciendo migrar los amplicones a través de capilares. Estas moléculas absorben la luz proveída por un láser y la emiten a una longitud de onda específica para cada fluorocromo. Al final del capilar, se encuentra un detector que analiza las emisiones y las traduce a un patrón de diferentes colores que corresponden a una longitud de onda particular. La computadora registra, como en el caso de un cromatógrafo, el tiempo de elusión, el tamaño en pares de bases, el área y la altura de cada pico. Este sistema permite trabajar varios microsatélites (siempre y cuando posean tamaño y fluorocromos diferentes), obtener información detallada de cada pico el cual corresponde a un alelo y dedicar el tiempo a otra tarea puesto que el proceso es automatizado.

La metodología de microsatélites para *T. cruzi* fue desarrollada originalmente por Oliveira *et al*, 1998, basándose en una técnica de ADN que amplifica repeticiones de CA. Este estudio sugirió que el parásito es diploide y multiclonal; las muestras que presentan uno o dos picos (uno o dos alelos) corresponden a diploides y se consideran monoclonales. La apariencia de más de dos picos en *loci* diferentes es indicativo de que más de una población está presente (policlonal). Se observó también que los aislados de pacientes crónicos son clonales mientras que los de reservorios son multiclonales. Se reveló una distancia genética alta entre las cepas, lo cual concuerda con el dimorfismo encontrado por amplificación de ARNr. (Oliveira *et al*, 1998; 1999).

4. Trabajos realizados en Guatemala. En Guatemala Rivera (2003) identificó loci correspondientes a microsatélites polimórficos en el genoma del *T. cruzi*. La caracterización se basó en la captura por afinidad de fragmentos ricos en microsatélites utilizando oligonucleótidos marcados con biotina, unidos a perlas magnéticas envueltas con estreptavidina, su clonación y luego secuenciación. A partir de estas secuencias se diseñaron cebadores específicos para amplificar 11 loci, de estos únicamente tres (MS3, MS5 y MS6) mostraron polimorfismo. Luego estos tres se amplificaron usando aislados de *T. cruzi* localizados en seis departamentos endémicos de Guatemala, en una región cercana al canal de Panamá en Panamá, en la provincia de Manabí de Ecuador y en dos estados del Brasil. Las muestras provienen de vectores: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens*; reservorios y humanos (Rivera, 2003).

La alta diferencia en los valores entre la heterocigosidad esperada y observada revela un fuerte desequilibrio de Hardy Weinberg. Este resultado puede apoyar ya sea a Oliveira *et al*, 1998 indicando una reproducción sexual escasa o ausente. No obstante, los valores de heterocigosidad observada muy bajos obtenidos en el estudio se pueden deber al alto número de alelos nulos, sobre todo en los locus MS5 y MS6 (Rivera, 2003).

El locus MS3 se caracteriza por presentar una serie de alelos no esperados espaciados del alelo más cercano por 23 pares de bases. Cuando se incluyó este alelo espaciado y los tres microsatélites descritos, el análisis filogenético reveló una segregación marcada en dos grupos denominados I y II. A estas muestras se les hizo un análisis mediante los marcadores TCI y TC II, según esto, el grupo II corresponde principalmente a TC II y ellos circulan en un ambiente silvestre pero tienen la capacidad de colonizar asentamientos humanos. Mientras que en el tipo 1 se observa una mezcla de linajes, que sugieren que hay una subdivisión basada en el hospedero del cual fueron aislados. Cabe mencionar que estos subgrupos presentan una fuerte distancia genética entre ellos. Por su parte, al analizar las muestras eliminando los alelos espaciados de MS3 se observó también la presencia de dos grandes

grupos, sin embargo la división no parece estar basado en los linajes sino que en los genotipos. Además, el menor valor de la distancia genética de Nei obtenida podría suponer una estructuración poco real (Rivera, 2003).

F. Recursos disponibles para esta tesis.

1. **Recolección de muestras y extracción de ADN.** Se recolectaron chinches del departamento de Chiquimula: municipios de Chiquimula, Olopa, Camotán, Jocotán, San Juan Ermita, Quezaltepeque, Concepción las Minas y Esquipulas. Hacer referencia a apéndice con el listado de muestras.

Los especímenes del campo fueron disectados en el laboratorio y las heces se recolectaron por punción rectal en tubos Eppendorf 1.5mL. Estas se preservaron dejándolas secar bajo campana. A continuación se realizó la extracción de ADN de las muestras del departamento de Chiquimula con el KIT ISOQUIK de Orca Research INC, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20°C (Comunicación personal Paola Rivera).

2. **Preparación del control positivo.** Se utilizó ADN correspondiente a la cepa H7 de *Trypanosoma cruzi* aislada originalmente de humano, el cual se almacenó el nueve de noviembre de 2002 en suero bovino fetal (FBS) y 5% dimetil sulfoxi (DMSO), a -80°C (Comunicación personal, Edgar Quemé). Esta cepa se revivió por descongelamiento rápido y se cultivó a 28°C por tres semanas en Infusión de hígado y triptosa (LIT) (Comunicado personal Paola Rivera).

A partir del cultivo se prepararon por medio de diluciones seriadas un stock de 500 y 5000 parásitos (cepa H7) / uL. Se tomaron 25uL de cada uno y se mezclaron con 100uL de heces no infectadas, de modo que se obtuvo

controles positivo de 100 y 1000 parásitos/uL de heces respectivamente. Este procedimiento se realizó usando heces de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* de la colección del insectario de la Universidad del Valle de Guatemala. Las preparaciones fueron preservadas de tres maneras: dejándolas secar bajo campana; 1:1 heces infectadas: PBS o 1:1:2 heces infectadas: PBS: Urea 8M. Se almacenaron alícuotas a -20°C (Comunicación personal Paola Rivera).

3. Análisis de minicírculo y microsatélites. El análisis de ADN de minicírculo es una técnica que permite diferenciar en base al tamaño del producto de PCR entre *T. cruzi* (330pb) y *T. rangeli* (450pb). Utiliza los cebadores S35 (5' AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA 3') y S36 (5' GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3').

La tipificación genética de *T. cruzi* en contenidos fecales de *R. prolixus* y *T. dimidiata*, se basa en los loci MS3 y MS5 desarrollados por Rivera, 2003, hacer referencia a figura 19 y 20. El locus MS3 corresponde a un dinucleótido (TG)₂₀, su alelo predominante es 190pb, sin embargo también puede presentarse como 231pb, para el análisis, el cebador “Foward” esta marcado con el fluorocromo 6FAM (azul). Por otro lado, el locus MS5 es un trinucleótido (CAA)₇, con alelo predominante 230pb, su cebador “Foward” esta marcado con HEX (verde).

Figura 19: Secuencia de referencia del locus MS3. En negrita se señala la posición de los cebadores y en sombreado el microsatélite.

```

1 ACTCAGCAGTGCAAACCCCTTTGATGCCTACAGCAAGGAGGCGCTCACTGCCCTTGCTAC
61 CGCTGGAGAAGAGGC
61 GAGGGACCAAGGTGAATAGTCTGCAATACTATTTCAAATGTCTACGCTGGAGAAGAGGC
121 AATAC 3' TCMS3-F
121 AATACAAAATGGATGAAAAAGAAGAGGGAGGGCTGTAGGAAGACGTTTTTGGACTGACTG
181 CTCAATGTAGAATCTGTTGACTGTATTTCTTCCATATGTCTGTCTGCTTGTGTGTGTGTG
241 ACTGCACGCGTTTATACTTA 5'
241 TGTGTGTGTCTATTTATTCTCTTCTCCTCGTGGATGACGTGCGCAAATATGAATG
301 TCMS3-R

```

Figura 20: Secuencia de referencia del locus MS5. En negrita se señala la posición de los cebadores y en sombreado el microsatélite.

```

1 ACCTTCACTACCCACAGCGGCCCGCCCATGTAATTCTGCTGCGTGTGACGCCGGTGCCTC
61 TCTAACAAC TGAAATGCAAGCGCACTTGCCGTCCTCTCTGCATTACTCAGAGGAAGGGTG
121 GCAAACGTCTCCTCTCTTTCCCGTGACACTGCTGCTGCATGACCGGCACGCTGCCATGC
181 CTTTAGGCTT
181 GTGCGCCGTCGCAGCCGACCAAAAATGACACGAGAAAACCTCATTCCTTTCTTTAGGCTT
241 GACGCACCTC 3' TCMS5F
241 GACGCACCTCGCAGCAACAGCGAGGCATTCAAATAAGTAACAAAGTGCGGAAGGCGGACG
301 GGGTTAAAGAGAAGTGAGGCGCCACACACACACACGGAAGAGGATACAACAACAACAACA
361 ACAACAACACACTCTGACGACTACTCGTCAAGAAATAGAAGCCAATATTTACCCCTCACGCT
421 ATAGCTGGTCGCTGTTTGTG 5' TCMS5R
421 GGAAGAATGCGGCAAATCAAATAAATATCGACCAGCGACAAACACAATCTTAAATCCACA
481 CACAAACACGCTTGC

```

En un estudio preliminar, utilizando un PCR simple, no se observó amplificación de estos loci posiblemente por que las muestras provienen de contenidos fecales, por esa razón se propuso un ensayo con PCR anidado (Comunicación personal, Paola Rivera).

III. JUSTIFICACIÓN

El ciclo de transmisión de *T. cruzi* es muy complejo, aún no está bien entendido ni se conoce con profundidad. En Guatemala, ha sido menos estudiado y las especificidades referentes a la región son poco conocidas.

En Guatemala, el ciclo doméstico incluye dos vectores, *R. prolixus* y *Triatoma dimidiata*. En Sur América, *R. prolixus* se relaciona con reservorios marsupiales y *T. dimidiata* con roedores y primates. Además de esto, en esa región se ha observado que ambos insectos evolucionaron en diferentes hábitats ya que *R. prolixus* es arborícola y se desarrolla en un ambiente selvático, por el contrario *T. dimidiata* es cavernícola y doméstico. Estas premisas, hacen pensar que pudo haber habido una coespeciación con *T. cruzi* lo que permitiría que diferentes cepas sean transmitidos por uno u otro vector. Además existe evidencia de una amplia variabilidad genética en *T. cruzi* que está basada en comportamientos biológicos, análisis bioquímicos y moleculares. La idea de coespeciación también está apoyada por las teoría de Gaunt & Miles, 2000 o Kawashita *et al*, 2001.

Se propone el uso de microsatélites polimórficos para diferenciar las cepas de *T. cruzi* transmitidas por uno u otro. Por el contrario la diferenciación de linajes llevada a cabo por Miles *et al*, 2001 está desarrollada para muestras brasileñas.

Para poder combatir la enfermedad de Chagas es necesario conocer estos ciclos de transmisión, los cuales en el futuro, junto a otros estudios pueden revelar diferencias en la competencia vectorial de ambas especies, el papel que juega cada cepa en la patogénesis, la presentación clínica de la enfermedad y control o programa de prevención más apropiado.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Determinar si existen diferencias en los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi* entre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* mediante la tipificación genética de los parásitos encontrados en estos vectores.

2. Objetivos específicos

- Usar un marcador molecular basado en la secuencia del minicírculo para diferenciar la infección de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en contenidos fecales de *Triatoma dimidiata* o *Rhodnius prolixus*.
- Determinar si existe diferencia significativa entre la frecuencia alélica de dos microsatélites amplificados de *Trypanosoma cruzi* en contenidos fecales de *Triatoma dimidiata* o *Rhodnius prolixus* simpátricos.

V. HIPÓTESIS

Existe diferencia genética entre las cepas de *Trypanosoma cruzi* transmitidas por *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* en condiciones simpátricas.

Ho: Las cepas de *Trypanosoma cruzi* en contenidos fecales de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* simpátricos son iguales.

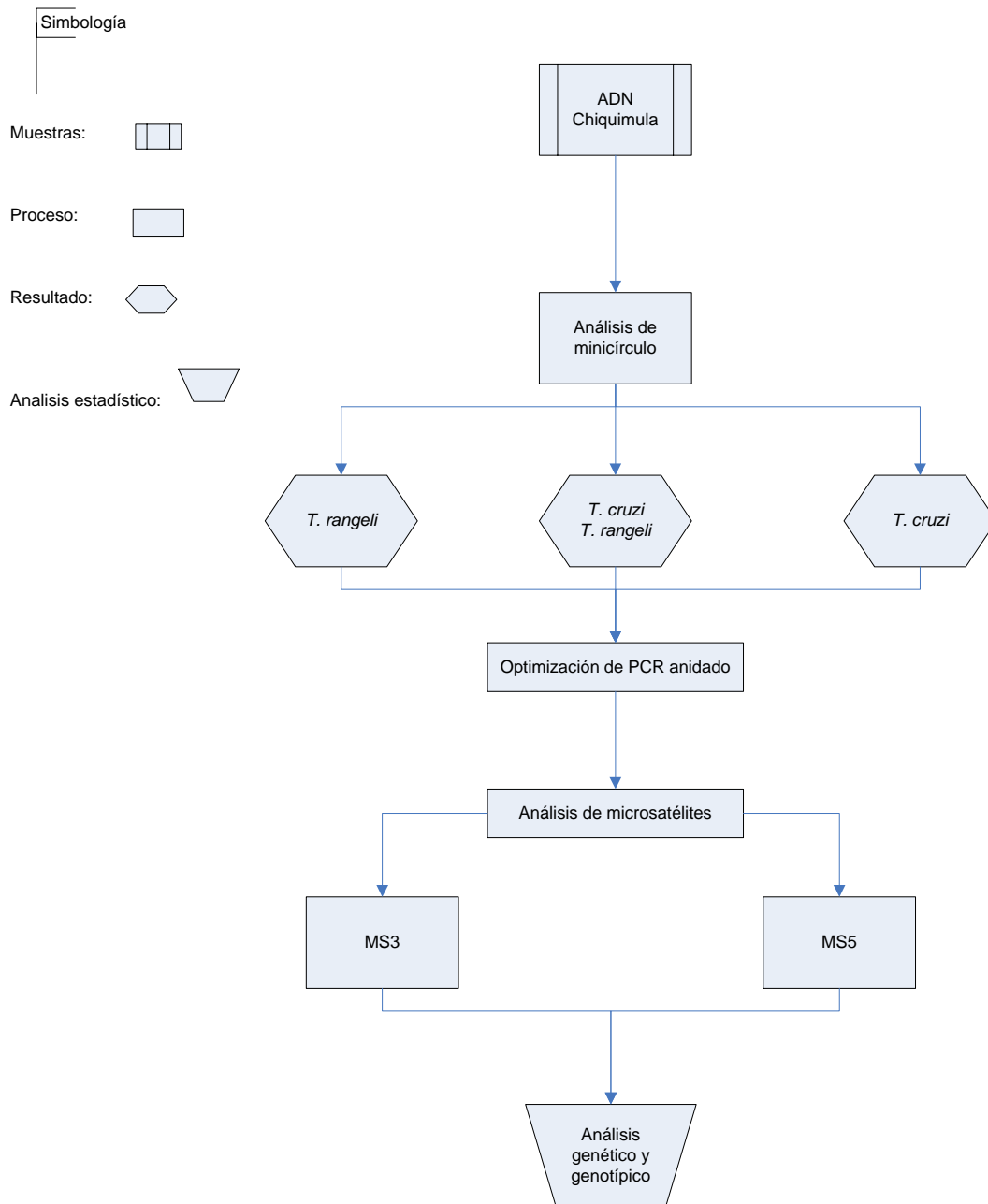
Ha: Las cepas de *Trypanosoma cruzi* en contenidos fecales de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* simpátricos no son iguales.

VI. METODOLOGÍA

Se recomienda hacer referencia a antecedentes para conocer los procedimientos realizados previos a esta tesis.

A. Diagrama de flujo

Figura 21: Diagrama de flujo del procedimiento a seguir



B. Procedimiento

1. Análisis del minicírculo:

a. PCR y tamizaje: El locus del ADN del minicírculo se amplificó usando el cebador degenerado S35: 5´AAA TAA TGT ACG GGK GAG ATG CAT GA 3´ y el cebador S36: 5´GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3´ (Avila *et al* 1990). La reacción se realizó a un volumen final de 25uL con: buffer Taq 1x (cf: 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9, 0.1% Triton X-100) (Promega, Madison, WI); 1mM MgCl₂ (cf: 1.5mM buffer Taq + 1mM extra = 2mM total); 0.02mM dNTP´s c/u; 0.4 uM cada cebador; 0.4U/uL Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI) y 1uL de templado. El programa (Icycler, Biorad, Hércules CA) consistió en desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y 50 segundos a 72°C. Luego una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los amplicones se analizaron con un gel de agarosa 2% por 30 minutos y tinción con bromuro de etidio. Los productos amplificados son de 330 y 450 pares de bases característico de *T. cruzi* y *T. rangeli* respectivamente (Vallejo *et al* 1999).

2. Análisis de microsatélites:

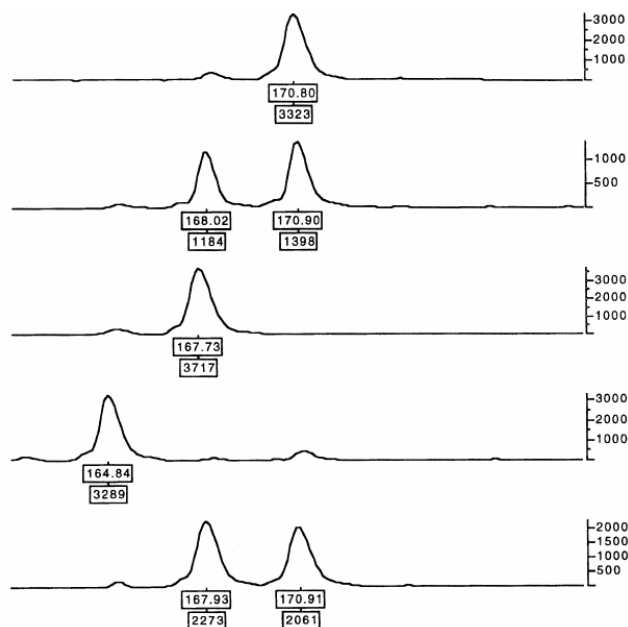
2. Análisis de microsatélites

a. PCR y tamizaje: La amplificación de microsatélites en contenidos fecales se hizo optimizando un procedimiento anidado, para lo cual se seleccionaron cebadores externos. Los criterios que se usaron fueron que tuvieran un T_m cercano a 60°C ($T_m = 2(A+T) + 4(G + C)$), que fuera de un largo de 20 nucleótidos y que se evitaran repeticiones de la misma base. Las secuencias que cumplieron con estos requisitos fueron evaluados en IDT SciTools disponible en línea, Biotools.idtdna.com (IDT, 2006). Los amplicones se tamizaron mediante una electroforesis nativa en geles de poliacrilamida 29:1 al 10% y el revelado se hizo con tinción plata siguiendo el protocolo de Castillo 2002 (información no publicada). Hacer referencia a apéndice para

detalles del procedimiento. Una vez optimizada la técnica, esta fue aplicada a las muestras.

b. Análisis de fragmentos por electroforesis capilar: El cebador “forward” de la reacción interna está marcado con un fluorocromo lo que permite la detección de alelos por electroforesis capilar. Algunas de las muestras se trabajaron en la Universidad de Arizona con el equipo ABI 3700 de Applied Biosystems y las otras en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta con el ABI 3100. Los electroferogramas se analizaron con los programas GeneScan 2.1 (Applied Biosystems) y Genotyper (Applied Biosystems) 1.1, con los cuales se obtuvo el tamaño de los picos en pares de bases, su intensidad y área. El método utilizado consiste en incluir en cada muestra una escalera estándar de pares de bases, en este caso fue *Rox*, a la cual se le aplica el método “Local Southern” para obtener la mejor línea recta y de ahí se extrapola para aproximar el tamaño del fragmento. En la figura 22 se muestra un ejemplo de un electroferograma.

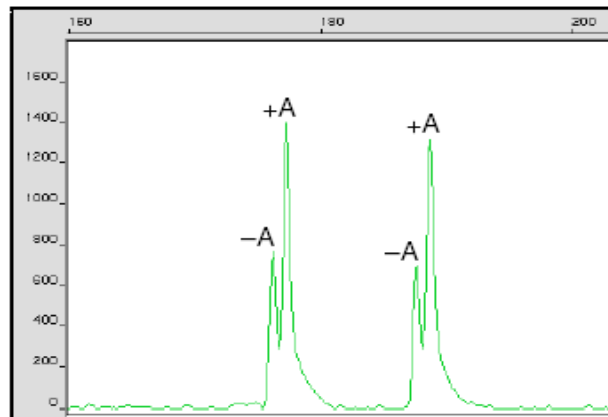
Figura 22: Electroferograma que muestra los alelos de un microsatélite dinucleótido. El eje “y” muestra la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) y el eje “x” es el tamaño del fragmento en pares de bases.



(Adaptado de Anderson, 1999)

La selección de los picos se hizo aplicando a las muestras una serie de criterios: (1) eliminación de la señal menor a 100 pares de bases producida por tetradímeros o dímeros de cebadores; (2) la intensidad de la fluorescencia mínima de 50 unidades necesaria para no confundir ruido con picos; (3) el múltiplo de repetición del nucleótido; (4) el límite inferior del tamaño del amplicón por la ausencia total del microsatélite; (5) la adición de adeninas por la polimerasa, hacer referencia a figura 23; (6) la formación de productos que poseen el múltiplo de repetición pero que son artefactos del PCR creados por la polimerasa al amplificar el fragmento (stturers), hacer referencia a figura 24. Hacer referencia al apéndice con el listado de criterios para la selección de picos verdaderos.

Figura 23: Fragmentos obtenidos en la electroforesis capilar debidos a adiciones de adenina por la polimera.

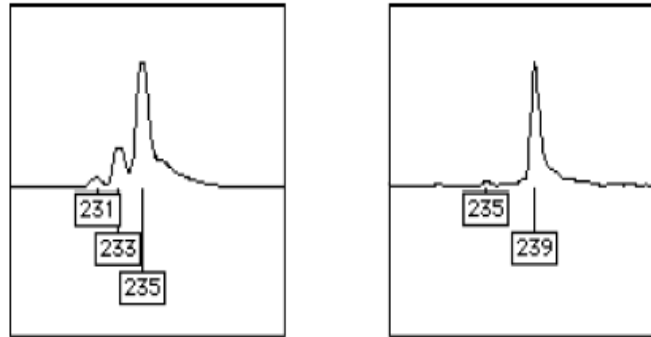


(Adaptado de Applied Biosystems, 2003)

c. Cálculos Estadísticos: Los picos obtenidos para cada muestra poseen un tamaño en pares de bases cuantificado como números reales. Para hacer la aproximación al número discreto correspondiente se usó el programa Allelogram desarrollado por Idury y Cardon en 1997 que se basa en una aproximación por mínimos cuadrados. Una vez obtenidos los picos verdaderos se obtuvieron distribuciones de frecuencias de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* por separado. Se compararon las frecuencias mediante el análisis genético y genotípico con el programa GenePop proporcionado por la

Escuela de Ciencias Biomédicas, Universidad de Tecnología Curtin, Australia y disponible en línea en <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>.

Figura 24: Fragmentos múltiples de la repetición del microsatélite pero que son artefactos de PCR creados por la polimeras (stturers).



(Adaptado de Applied Biosystems, 2003)

Se construyó un árbol filogenético mediante la herramienta Phylip 3.67 disponible en línea. Se hizo un análisis de bootstraps de 1000 repeticiones y se consideraron significativas aquellas ramas que aparecen en más del 75% de las repeticiones. La distancia genética se calculó mediante el algoritmo de Cavalli-Sforza y el árbol se construyó con Neighbor-Joining. Se usó de outgroup una muestra de *T. cruzi* aislada de un perro (*Canis familiaris*) de Ecuador.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Análisis de minicírculo

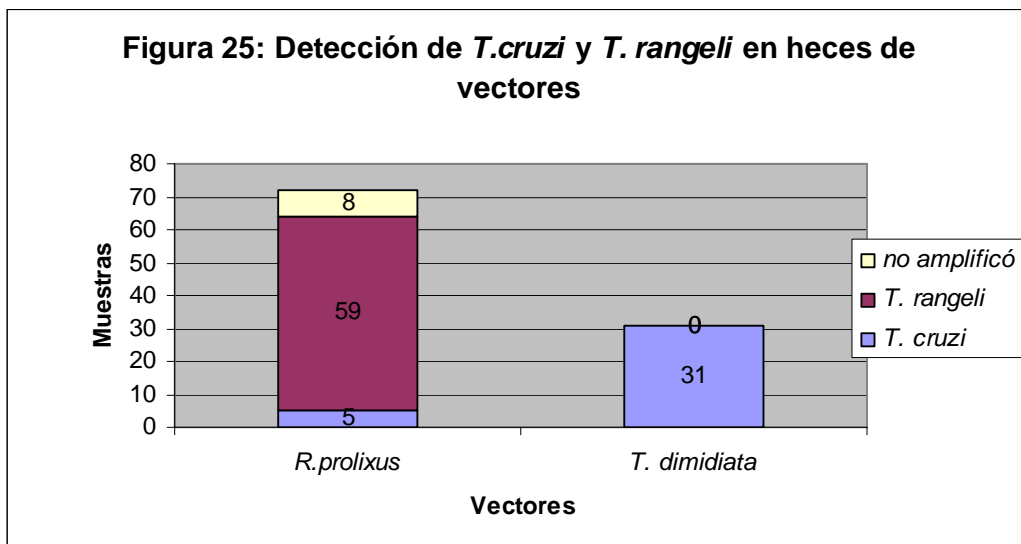
1. PCR y tamizaje. Las muestras de ADN extraídas de heces positivas por microscopía de *R. prolixus* y *T. dimidiata* fueron sometidas a un análisis con la secuencia del minicírculo que tenía por objeto discriminar entre aquellas infectadas por *T. cruzi* o *T. rangeli*. En el cuadro 5 y en a Figura 24 puede verse que todas las muestras de *T. dimidiata* estaban infectadas con *T. cruzi* (31/100, 100%), mientras que las provenientes de *R. prolixus* estaban e su mayoría infectadas por *T. rangeli* (59/72, 81.9%), en menor grado con *T. cruzi* (5/72, 6.9%) y otras no amplificaron (8/72, 11.1%).

Cuadro 5: Verificación de especies en las muestras de heces

Vector	Parásito	Frecuencia	%
R. prolixus	<i>T. cruzi</i>	5	6,9444
	<i>T. rangeli</i>	59	81,944
	No amp	8	11,111
	Total	72	100
T. dimidiata	<i>T. cruzi</i>	31	100
	<i>T. rangeli</i>	0	0
	No amp	0	0
	Total	31	100

Las muestras seleccionadas para el estudio fueron aquellas que presentaron infección positiva de la glándula rectal por microscopía. La infección en el vector inicia al ingerir sangre contaminada con el parásito en su estadio de tripomatigote, luego este viaja al estómago donde se transforma a epimastigote, pasa por una etapa de división binaria en el intestino y finalmente viaja al recto en donde se transforma a tripomastigote metacíclico

que es la forma infectiva de *T. cruzi*. Por su parte *T. rangeli* se multiplica en el intestino, luego invade la hemolinfa y finalmente llega a las glándulas salivares en donde ocurre la metacicloogénesis. Por esta razón se considera que una infección positiva en la glándula rectal corresponde a *T. cruzi* y una en glándula salival es *T. rangeli*. Sin embargo, como puede observarse en el cuadro 5 y figura 25 las heces de *R. prolixus* se encontraron principalmente infectadas con *T. rangeli* (59/72).



Este comportamiento puede explicarse en la forma en que se realiza la disección de los vectores y la toma de la muestra de heces. Durante la disección se presiona la caja torácica de los insectos y la primera porción de heces que sale se considera como el contenido del recto (esta es la porción que se observa al microscopio) a continuación se siguen obteniendo porciones las cuales se consideran como el contenido intestinal y estomacal. Este método tiene la desventaja de que los insectos deben contener una cantidad suficiente de heces, de otra manera no se puede dividir en porciones y todo el contenido rectal, intestinal y estomacal se mezcla. Así *T. rangeli* presente en el estómago puede mezclarse con las heces y dar falsos positivos por microscopia.

El método de amplificación de minicírculo puede discriminar entre *T. cruzi* y *T. rangeli* por el tamaño de bandas que presenta, 330 y 450 respectivamente. No obstante en mezclas, cuando uno de los dos parásitos es mucho más abundante que el otro, hay una competencia del templado por los cebadores que se desenvuelve a favor del abundante. Como consecuencia una infección mixta puede parecer debida a un solo parásito (Vallejo 1999). Otro detalle que se debe considerar cuando se esperan infecciones mixtas es el uso preferencial de poliacrilamida sobre agarosa para obtener una mejor resolución de las bandas.

El grupo de muestras de *R. prolixus* son las únicas que mostraron un porcentaje de negativas (no amplificación). La significancia estadística de este hallazgo se evaluó mediante Fisher exacto (hacer referencia a cuadro 6) y se obtuvo un p de 0.0503. Este número está en límite de la confianza al 95%, sugiriendo que podría haber una diferencia, tal como factores de inhibitorios del minicírculo en las heces de *R. prolixus* que no se encuentra en *T. dimidiata*. No obstante se necesitan más datos para corroborar este hallazgo.

Cuadro 6: Comparación entre el número de muestras de cada vector que amplificaron con el marcador del minicírculo.

	PCR		Total
	+	-	
<i>T. dimidiata</i>	31	0	31
<i>R. prolixus</i>	64	8	72
Total	95	8	103
Fisher exacto, p = 0.0503			

La amplificación de microsatélites será discutida en otro apartado, sin embargo es necesario decir que fue desarrollado y optimizado para amplificar únicamente *T. cruzi*. Por esta razón la detección de *T. cruzi* puede correlacionarse con la detección usando la secuencia del minicírculo, así puede verse que hay correlación entre ambos marcadores en 89 de 103 muestras (86.4 %) mientras que en 14 de 103 casos (13.59%) no hubo. Hacer

referencia a cuadro 7. Se encontraron 8 muestras que son positivas para *T. cruzi* por la secuencia del minicírculo pero que no se lograron amplificar con los microsatélites, esto puede ser porque la concentración de parásitos es muy pequeña. El minicírculo es más sensible ya que se encuentra en múltiples copias, el kinetoplasto posee una red de 20,000 a 30,000 minicírculos, este número de copias permite que en 0.015fg de ADNk hayan aproximadamente 10 moléculas (Sturm *et al*, 1989). La secuencia de los microsatélites se presenta solamente dos veces en el genoma, por eso fue necesario optimizar una reacción anidada para su detección. También se encontraron 6 muestras que se consideraron positivas por la amplificación de algún microsatélite pero *T. rangeli* o negativas cuando se analizaron con minicírculo. Como se explicó antes, este hecho puede entenderse diciendo que esas muestras fueron mezclas de parásitos en donde *T. rangeli* era abundante. No se considera como una contaminación en el ensayo de microsatélites porque se tomaron las precauciones necesarias y los controles negativos no presentaron bandas (datos no mostrados).

Cuadro 7: Detección de *T. cruzi* según marcador basado en minicírculo o en microsatélite

Marcador		Número de Muestras
S35/S36	MS	
+	+	28
+	-	8
-	+	6
-	-	61
Total:		103

La técnica de detección de *T. cruzi* mediante la secuencia del minicírculo también puede compararse con la de microsatélites calculando la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. En ese análisis se usó la prueba de microsatélites como estándar de oro (hacer referencia cuadro 8). Al considerar únicamente las muestras de *T. dimidiata* (hacer referencia cuadro 9), se observa que la sensibilidad es del 100%, es decir que

la técnica de minicírculo detecta *T. cruzi* en todas las muestras realmente positivas, sin embargo la especificidad es de 0% porque la técnica no fue capaz de asignar negativo a ninguna de las muestras que fueron negativas por microsatélites. Como se explicó antes, los microsatélites son menos sensibles que el minicírculo. El valor predictivo positivo indica que el 74% de las muestras serán positivas para ambas pruebas. En el caso de *R. prolixus* (hacer referencia cuadro 10), la sensibilidad es del 45% porque alrededor de la mitad de los positivos con microsatélite no concuerdan con la detección usando minicírculo, esto puede deberse a la competencia de templado cuando *T. cruzi* esta presente pero *T. rangeli* esta en mayor concentración. Además, queda abierta la posibilidad de factores inhibitorios de minicírculo en las muestras provenientes de *R. prolixus*. La especificidad es del 100% ya que los resultados negativos se correlacionaron entre los dos marcadores. Del mismo modo, el valor predictivo positivo fue del 100%, en cambio el valor predictivo negativo es del 91% indicando que este es el porcentaje de muestras que serán negativas en ambas pruebas.

Cuadro 8: Evaluación de la detección de *T. cruzi* mediante el método basado en la secuencia del minicírculo usando como estándar de oro en los resultados obtenidos por el análisis de microsatélites

	Muestras de <i>T. dimidiata</i> (%)	Muestras de <i>R. prolixus</i> (%)	Total de muestras (%)
Sensibilidad	100	45	82
Especificidad	0	100	88
Valor predictivo positivo	74	100	78
Valor predictivo negativo	Indeterminado	91	91

El aislamiento de *T. rangeli* en *R. prolixus* y no en *T. dimidiata* no es inesperado, ya que según Gaunt y Milles 2000 y otros autores hay una asociación evolutiva entre *T. rangeli* y *R. prolixus*. No obstante, la tasa de

infección encontrada en este trabajo (59/72, 81.9%) es un dato que debe confirmarse y profundizarse con otros estudios por la importancia que presenta. Una tasa de infección tan alta hace que se recomiende revisar el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, que se reevalúe la capacidad vectorial de *R. prolixus* y que la infección en humanos detectada serológicamente pueda estar sobrevalorada. De modo que este resultado es la base para que se abra una nueva línea de investigación en el área del ciclo de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Cuadro 9: Detección de *T. cruzi* en muestras de *T. dimidiata* según marcador basado en microsatélite o minicírculo.

	Microsatélite +	Microsatélite -
Minicírculo +	23	8
Minicírculo -	0	0

Cuadro 10: Detección de *T. cruzi* en muestras de *R. prolixus* según marcador basado en microsatélite o minicírculo.

	Microsatélite +	Microsatélite -
Minicírculo +	5	0
Minicírculo -	6	61

B. Análisis de microsatélites

1. **PCR y tamizaje:** La primera etapa del análisis de microsatélites fue la validación de los marcadores. Estos fueron desarrollados en el laboratorio del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala por Rivera 2003, con el objeto de crear marcadores moleculares polimórficos que puedan diferenciar entre cepas de *T. cruzi*. En el año 2005 se publicó la secuencia completa de *T. cruzi* la cual da evidencia de ser un organismo diploide en donde las proteínas codificadas por los genes representan pares alélicos (El-Sayed, *et al* 2005). Esta información hizo

necesaria la validación de los microsatélites mediante su identificación en el Banco de Genes disponible en línea, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank (NCBI, 2006). Las secuencias generadas en el laboratorio casaron con dos fragmentos secuenciados en el 2005, hacer referencia a cuadro 11, por lo que se sugiere que ambos provienen de cromosomas homólogos, sin embargo los fragmentos aún no han sido mapeados.

Cuadro 11: Identificación de secuencias homólogas en el genoma de *T. cruzi*.

Microsatélite	Blast, Número de acceso	P	Región	Alineación Store
MS5	gb AAHK01002220.1	3e-137	3602-3931, 3983-4102	93
	gb AAHK01000529.1	2e-135	4172-4498, 4553-4670	
MS3	gb AAHK01006137.1	1e-99	738-950	97
	gb AAHK01000154.1	2e-98	25630- 25416	

El microsatélite 3 presenta un grupo de alelos que se distribuyen alrededor de 192 pares de bases y otro grupo que se distribuye alrededor de 230 pares de bases. Las diferencias entre uno y otro grupo llevaron a considerar si estos son homólogos o no. Se buscaron las secuencias en el Banco de Genes (NCBI, 2006) y luego se alinearon los microsatélites junto con sus áreas flanqueantes usando el programa ClustalW disponible en línea, www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html (EMBL-EBI, 2006). Coincidentemente una de las secuencias posee una repetición del satélite de 8 y la otra de 16 pares de bases, lo que puede correlacionarse con los picos a 192 y 230 pares de bases. La alineación produjo una alineación del 97% por lo que se considera que son alelos del mismo locus, hacer referencia a figura 26.

La optimización del PCR anidado dio inicio con la creación de los cebadores externos. Se analizaron los posibles homodímeros y heterodímeros

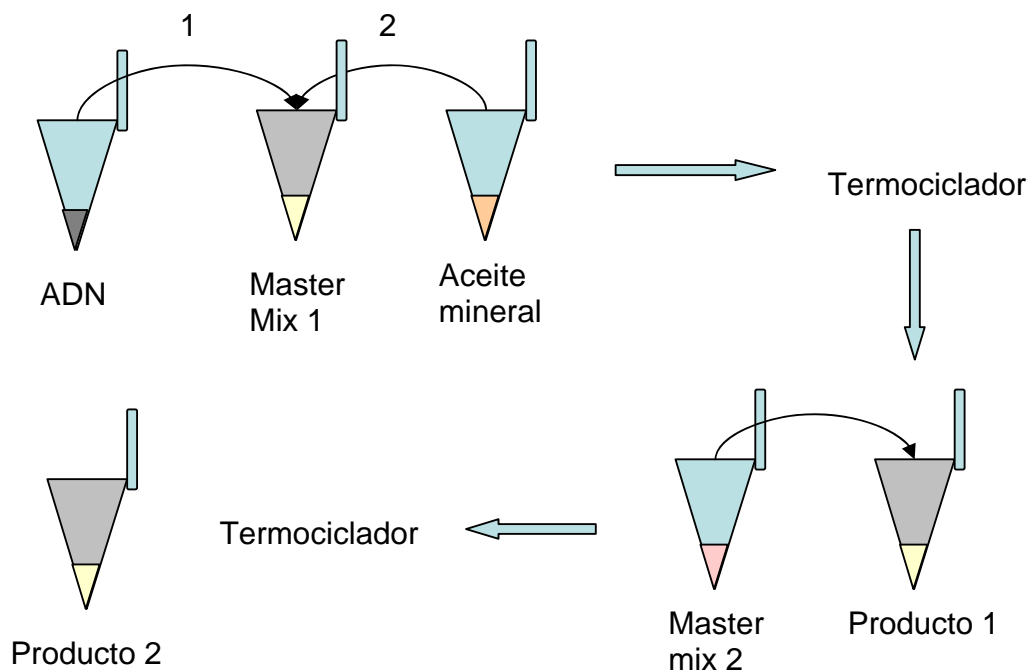
En el microsatélites 3, no se encontró ninguna secuencia reversa que cumpliera con los requisitos establecidos, por lo que se desarrolló un PCR semianidado. La razón de que no se encontrara es que la selección de los cebadores se hizo con las secuencias generadas en el laboratorio, la región conocida era corta y presentó repeticiones de la misma base.

Se diseñó un PCR anidado para la identificación de microsatélites de *T. cruzi* en heces porque esta matriz puede contener inhibidores que no permitan la amplificación de las hebras templado. La composición de la reacción interna y externa fue la misma excepto por la concentración de la polimerasa y de los cebadores, esta se basó en la suposición de que las concentraciones de los reactivos se encuentran en suficiente exceso para no ser factores limitantes en la segunda ronda de amplificación. La concentración óptima de magnesio fue seleccionada amplificando controles con concentraciones de 1.5, 2.5 y 3.5mM y entre ellas se eligió 1.5mM. La concentración de cebadores se eligió en base al protocolo de amplificación de microsatélites a partir de cultivos de *T. cruzi*, usando 0.20mM en la reacción externa y así como en la interna, sin embargo en los cálculos debe considerarse que existe un factor de dilución al mezclar ambas reacciones (Rivera 2003). Se usó una polimerasa “hot start” para que la reacción tuviera mayor especificidad y se agregó únicamente en la primera reacción porque se demostró que la eficiencia de la amplificación no mejoraba al agregarla en ambas fases y que por lo tanto no se justificaba el gasto adicional (datos no mostrados). La temperatura de hibridización se seleccionó amplificando controles a 58, 54.7 y 48°C, de entre ellas se eligió 58°C por ser la temperatura en que se observaron bandas más específicas. Cuando la temperatura es menor, los cebadores pueden hibridizarse con el templado de forma no específica y así amplificar bandas inespecíficas.

El diseño de protocolo consideró la facilidad con la que una reacción de tipo anidado se puede contaminar con ADN de otra muestra. La fuente de contaminación que se evitó con más empeño es la causada por los aerosoles que se producen al abrir un tubo que contenga una muestra con la primera

fase de amplificación. Para esto se siguieron dos estrategias, la primera consistió en amplificar las dos reacciones en un mismo tubo para que no haya necesidad de manipular el ADN y la segunda fue colocar una gota de aceite mineral en la primera reacción para que al abrir el tubo no se liberaran aerosoles. Hacer referencia a figura 27 y al apéndice en donde se detallan otras estrategias para evitar la contaminación.

Figura 27: Diseño del PCR en un solo tubo para la amplificación anidada de microsatélites.



El protocolo externo para ambos microsatélites se realizó a un volumen final de 20uL con: buffer Tap 1x (10X: 160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670mM Tris-HCl pH 8.8 a 25°C, 0.1% Tween 20) (CLP, Chicago, IL); 1.5 mM MgCl_2 ; 2.5 mM dNTP's c/u; 20 uM cada cebador; 0.5U/uL *Tap* ADN polimerasa (CLP, Chicago, IL) y 1uL de templado. El protocolo para la reacción interna difiere del primero en que la concentración de los cebadores respecto al cóctel de reactivos interno es 0.25uM y que no se agrega más polimerasa. El programa de ambas reacciones consiste en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos que consisten en desnaturalización a 94°C por 30 segundos,

hibridización a 58 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 45 segundos.

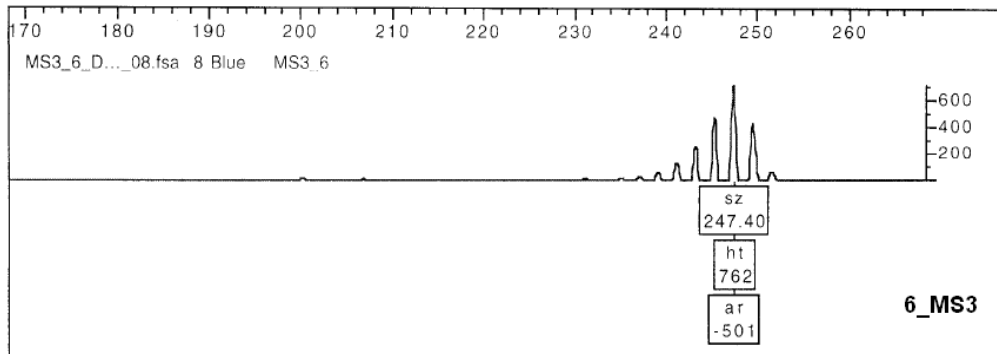
2. Análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis capilar, una parte en la Universidad de Arizona y la otra en El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Los datos que se obtienen corresponden a tamaño en pares de bases, intensidad de fluorescencia y área del pico. Aunque estos análisis se hicieron con equipos de la misma marca, el modelo fue diferente y por eso, se observaron diferencias en los resultados. En base al control interno de la cepa H7, se observó que los picos diferían en un nucleótido, esto se solucionó sumando un entero a los datos del ABI 3100. Además, las muestras tamizadas en el ABI 3100 mostraron picos con la punta cuadrada y datos negativos, hacer referencia a figura 28. Una de las posibles causas de estos efectos es que la línea base esté configurada para una fluorescencia muy alta. Este parámetro no pudo cambiarse en GeneScan 1.1 porque debió haberse hecho en el equipo directamente. También, nótese que se usó tanto la versión MAC como la versión Windows por lo que fue necesaria la conversión de datos de una plataforma a otro. En esta conversión sólo se manipulan los atributos y no el contenido de los archivos (Applied Biosystems, 2000). Sin embargo para que los resultados sean completamente comparables se recomienda *realizar* el análisis en un mismo equipo y la misma versión del software.

La selección de los picos se hizo aplicando a las muestras una serie de criterios: (1) eliminación de la señal menor a 100 pares de bases producida por tetradímeros o dímeros de cebadores; (2) la intensidad de la fluorescencia mínima de 50 unidades necesaria para no confundir ruido con picos; (3) el múltiplo de repetición del nucleótido; (4) el límite inferior del tamaño del amplicón por la ausencia total del microsatélite; (5) la adición de adeninas por la polimerasa; (6) la formación de productos que poseen el múltiplo de repetición pero que son artefactos del PCR creados por la polimerasa al

amplificar el fragmento (stturers). Hacer referencia al apéndice con el listado de criterios para la selección de picos verdaderos.

Figura 28: Ejemplo de muestra tamizada en el CDC y que presentó la base cuadrada y fluorescencia negativa



Cuando se analizaron los picos se observó que estos difirieron en la intensidad de la fluorescencia. El límite de detección para cada microsatélite analizado con uno u otro equipo parece ser diferente. Es decir que un pico de cierta intensidad podía ser detectado en un equipo pero estar bajo el límite en el otro. O bien que la cantidad de ADN en un principio fuera tal que produjera una mayor señal dándole oportunidad a aquellos picos que se encuentran en menor proporción para que también puedan observarse. Si estos mismos alelos de menor proporción se encontraran en una matriz con poco ADN no serían detectables, hacer referencia a figura 29. Por estas razones se hizo necesario normalizar los datos de modo que estos fueran comparables y que los alelos de menor proporción tuvieran la misma probabilidad de ser detectados. La normalización de los datos se hizo calculando el porcentaje del pico secundario con respecto del pico principal de cada muestra, luego se identificó la muestra que tuviera el pico principal de menor intensidad y el porcentaje obtenido anteriormente se correlacionó con el límite de ADN que puede ser detectado cuando se está seguro que hay poco ADN en la muestra. El porcentaje se comparó con el resto de porcentajes de las demás muestras y se eliminaron los picos que poseyeran un porcentaje menor, hacer referencia a figura 30. La pérdida de información esta justificada por datos de mejor calidad y que sean comparables. Este

procedimiento se realizó para cada equipo y cada microsatélite. Otra alternativa para la normalización es cuantificar la concentración de ADN y agregar cantidades similares en cada reacción de amplificación.

Figura 29: Diferencia en la detección de alelos considerando que se encuentran en la misma proporción uno de otro pero que la cantidad de ADN inicial es diferente (el límite de detección es de 50 unidades de fluorescencia).

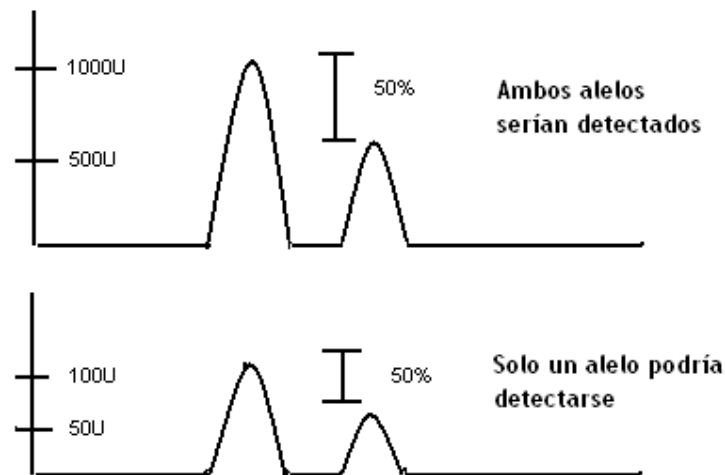
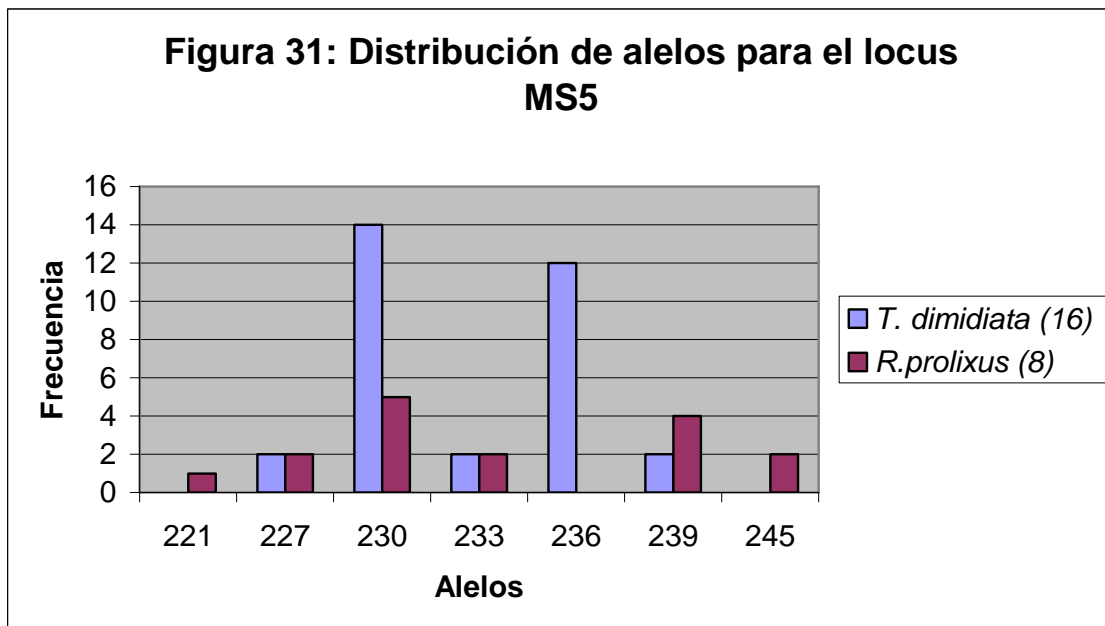


Figura 30: Procedimiento para la normalización de alelos.

ARIZONA 3		size	height	area	Ratio	% al pico principal	
A02_12_2993	12	191,54	8751	29684	0,29	100,00	
		226,55	404	1506	0,27	4,62	Eliminar
B03_25_2993	25	191,67	1398	5033	0,28	100,00	
C04_86_2724	86	191,68	3890	13560	0,29	100,00	
C06_102_272	102	235,48	110	453	0,24	100,00	
E03_80_2724	80	191,57	10925	36687	0,30	100,00	
E04_88_2724	88	220,36	271	1003	0,27	17,08	
		228,47	1587	5765	0,28	100,00	
		249,22	331	1221	0,27	20,86	
E05_96_2724	96	191,64	2384	8457	0,28	100,00	
F02_73_2724	73	257,65	371	1471	0,25	100,00	
F03_81_2724	81	230,65	640	2316	0,28	100,00	
F04_89_2724	89	191,56	4373	15059	0,29	100,00	
		232,66	150	619	0,24	3,43	Eliminar
F05_97_2724	97	191,61	3583	12257	0,29	100,00	
		340,77	169	2306	0,07	4,72	Eliminar
F06_s8_2993	CM001R1C	193,74	1256	4371	0,29	100,00	
		247,18	134	526	0,25	10,67	
G03_82_2724	82	191,72	2367	8801	0,27	100,00	
		232,82	147	632	0,23	6,21	Eliminar

3. **cálculos estadísticos.** Los picos verdaderos identificados con GeneScan y Genotyper se encuentran como números decimales, los nucleótidos son moléculas discretas por lo que se necesita aproximar el decimal al entero. Este proceso puede ser un factor de error especialmente cuando la repetición es un dinucleótido, porque si se le aproxima hacia el entero erróneo se le puede establecer como un alelo que no es el real. La aproximación se hizo en el software Allelogram mediante un análisis de mínimos cuadrados que toma en cuenta el histograma de frecuencias de los alelos para asignar los valores enteros.

Los valores enteros obtenidos de Allelogram fueron graficados en una distribución de frecuencias, hacer referencia a figuras 31-34. En el locus MS5 hay una mayor frecuencia de los alelos 230 y 236 para las muestras de *T. cruzi* aisladas de *T. dimidiata*, mientras que los alelos predominantes de *T. cruzi* aislado de *R. prolixus* son 230 y 239. En el locus MS3 la diferencia alélica entre uno y otro aislado se marca por la presencia de picos alrededor de 190 para *T. dimidiata* y 257 para *R. prolixus*.



**Figura 32: Distribución de alelos para el locus MS5
(frecuencia porcentual)**

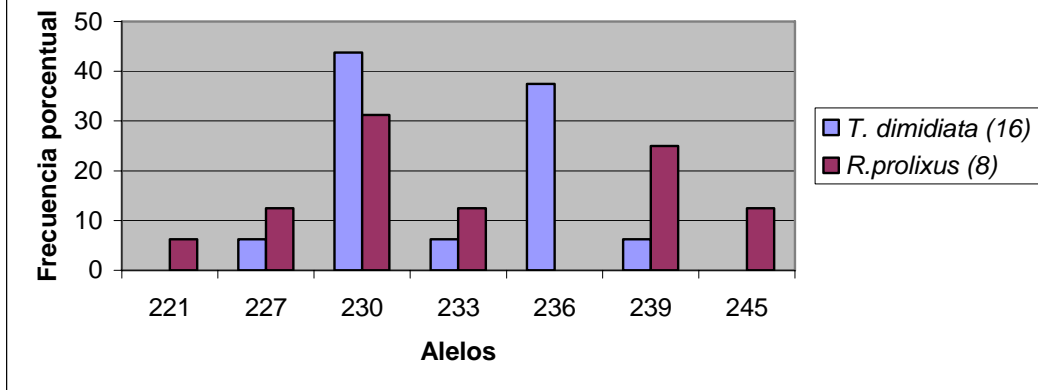
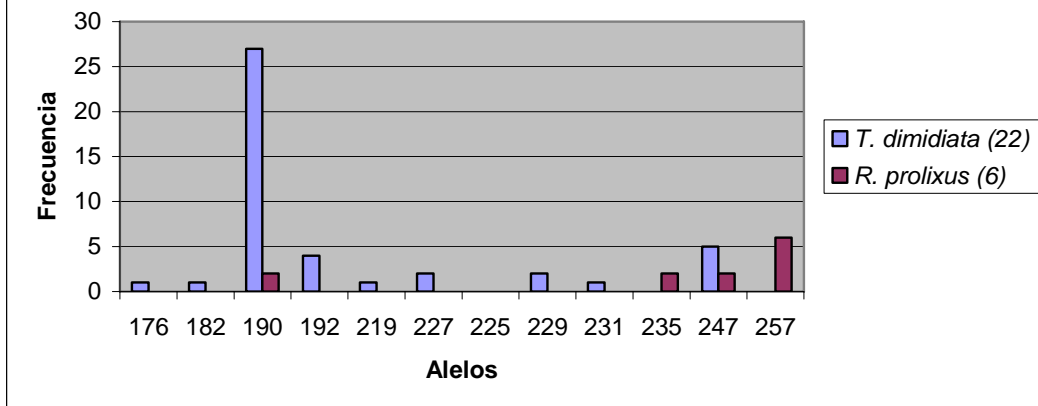
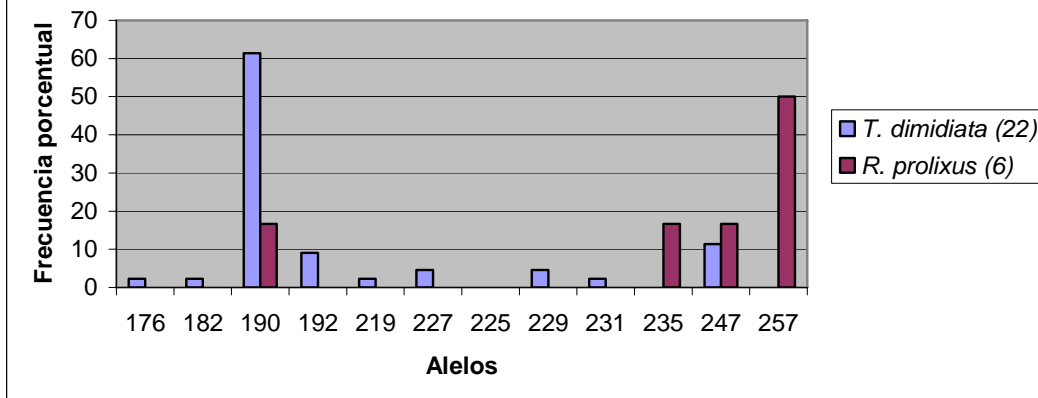


Figura 33: Distribución de alelos para el Locus MS3



**Figura 34: Distribución de alelos para el Locus MS3
(frecuencia porcentual)**



El análisis con microsatélites presentó alelos nulos ya que en algunas muestras solamente uno de los loci amplificó. En el cuadro 13 se muestran las frecuencias según el vector, se observa que hay una mayor cantidad de nulos en MS5 y que la mayoría de estos proviene de aislados de *T. dimidiata* mientras que la mayoría de nulos en MS3 proviene de *R. prolixus*. Sin embargo, no existe diferencia significativa entre los dos vectores (Fisher's, $p = 0.12$).

Cuadro 13: Frecuencia de alelos nulos en microsatélites

	MS5 nulos		MS3 nulos	
	Frecuencia	%*	Frecuencia	%*
<i>T. dimidiata</i>	7	20,59	1	2,94
<i>R. prolixus</i>	3	8,82	5	14,71
Total	10	29,41	6	17,65
Fisher's exact test, $p = 0.12$				

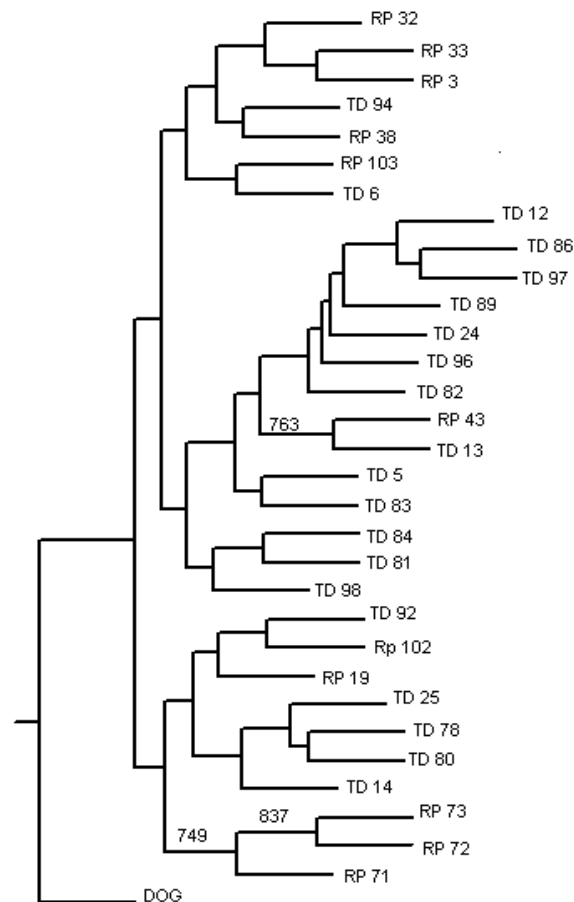
* El porcentaje se hizo sobre un total de 34 que corresponde al número de muestras positivas para alguno o ambos microsatélites

Los alelos nulos son definidos en este estudio como aquellos que no amplificaron pero que se comprobó con otro marcador que sí había ADN de *T. cruzi*. En estos casos puede intentarse repetir la amplificación diluyendo el templado si se sospecha que la muestra tenía inhibidores o agregando más templado si el ADN es escaso. Otra de las posibles causas es que los cebadores no hibridaron debido a algún cambio en la secuencia del templado. Si éste es el problema, la disminución de la frecuencia de estos alelos puede hacerse desarrollando cebadores que hibriden en otra posición. No obstante, en este estudio parece ser que la causa de los alelos nulos no son únicamente los inhibidores ni la cantidad de ADN ya que no se encontró ninguna correspondencia entre la intensidad de señal de alelo con un marcador y la presencia de un alelo nulo con otro marcador en la misma muestra.

Se construyó un árbol filogenético mediante la herramienta Phylip 3.67, hacer referencia a figura 35. Los bootstraps significativos se muestran sobre

las ramas del árbol. Con este análisis no se puede observar una diferenciación clara entre los aislados de *T. cruzi* provenientes de *R. prolixus* y los de *T. dimidiata*. Con el fin de mejorar el análisis se probaron diferentes outgroups y diferentes algoritmos dentro de Phylip, sin embargo la estructura del árbol permaneció igual. La diferenciación podría mejorarse usando más marcadores moleculares y no necesariamente aumentando el número de muestra.

Figura 35: árbol filogenético que relaciona aislados de *T. cruzi* de heces de *R. prolixus* (Rp) y *T. dimidiata* (Td). El árbol se construyó con con Phylip 3.67. El outgroup es un aislado de *T. cruzi* de Perro (*Canis familiaris*). Los bootstraps significativos se muestran sobre las ramas.



La diferencia génica y genotípica fue evaluada mediante el programa Genepop proporcionado por la Universidad Curtin en Australia. El método estadístico utilizado para la comparación es la prueba exacta de Fisher y Chi2,

ambos calculan la diferencia entre datos observados y datos esperados, sin embargo Chi2 da un estimado del valor probable real, este estimado es impreciso cuando el margen es muy diferentes y si son muy pocos valores (menos de 5). Hacer referencia a cuadro 14 con los resultados estadísticos para diferencia de poblaciones.

Cuadro 14: Comparación génica y genotípica entre *T. cruzi* aislados de *R. prolixus* (n = 11) y *T. dimidiata* (n = 24).

Marcador molecular	Prueba Estadística	Génica		Genotípica	
		probabilidad	SE / Chi2	probabilidad	SE / Chi2
MS3 (n = 29)	Fisher's exact test	0.00000	0.00000	0.00494	0.00091
MS5 (n = 24)	Fisher's exact test	0.00176	0.00040	0.12473	0.00389
Ambos (n = 35)	Chi2 (df = 4)	0.00000	infinito	0.00517	14.784

Según los resultados mostrados en el cuadro 14 sí existe diferencia génica ($p = 0.00000$) y genotípica ($p = 0.00517$) entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de diferentes vectores. Esto es una evidencia a favor de la teoría de coespeciación vector-parásito que ocurrió a través del tiempo, indicando que las cepas tienen un alto grado de adaptación con su vector correspondiente. Estos datos son determinantes porque las relaciones específicas de los vectores con sus parásitos influyen en las diferencias en los ciclos de transmisión de la enfermedad. Las estrategias de control, prevención y tratamiento deben considerar estas diferencias para que puedan ser efectivas.

Este resultado abre la posibilidad de que la patogenicidad de las cepas sea diferente. Este fenómeno ha sido observado antes, en Sur América hay evidencia inmunológica de que la mayor parte de infecciones humanas están relacionadas con TCII (Di Noia *et al.*, 2002). Según la teoría de evolución y coespeciación (Gaunt & Miles, 2000) esta cepa está asociada con la tribu

Triatomini. Sin embargo las pruebas de patogenicidad deben llevarse a cabo con cepas guatemaltecas para tener un mejor conocimiento de lo que ocurre en este país.

La información también debe correlacionarse con la capacidad de cada vector para transmitir el parásito. En este campo, se ha descrito que *R. prolixus* posee características biológicas y del comportamiento que favorecen la transmisión de *T. cruzi*, entre estos están el ciclo de vida más corto, la infestación en el área doméstica y el patrón de defecación rápida después de alimentarse. En este estudio se encontró que 59 / 72 muestras de heces de este vector estaban infectadas con *T. rangeli* y 5 / 72 con *T. cruzi*. Sugiriendo que la capacidad vectorial puede ser menor de la esperada.

La patogenicidad de TCII y la tasa de infección sugiere que debe estudiarse a *T. dimidiata* en su rol como transmisor de la enfermedad en Guatemala. No obstante, se necesita conocer más acerca de la patogenicidad de las cepas y la tasa de infección no debe ser el único parámetro a considerar; pues podría existir una pequeña tasa de infección pero una alta efectividad en la transmisión así como una alta patogenicidad de la cepa y todo esto contribuir al desarrollo de la enfermedad.

El control de los vectores como estrategia de prevención de la enfermedad debe estar ligada a estos conocimientos para enfocarse en aquel vector que tenga la mayor capacidad vectorial. Los vectores se diferencian en cuanto a su comportamiento, por ejemplo, se han encontrado focos silvestres de *T. dimidiata* en Guatemala mientras que esto no ha ocurrido con *R. prolixus*, así que existe la posibilidad de reinfestación del primer vector si las estrategias se basan en rociamiento residual en hogares.

Los resultados obtenidos en este estudio son muy interesantes en cuanto al estudio ecológico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo la cantidad de muestras puede ser una limitante en la significancia de las estadísticas. En este contexto se utilizó la prueba no

paramétrica de Chi², pero ésta posee la limitante que se necesitan 5 ó más alelos para cada categoría en la tabla de contingencia. Por lo tanto se recomienda profundizar en la línea de investigación con microsatélites incluyendo más muestras. A su vez se recomienda utilizar el marcador del miniexón desarrollado para sur América, el cual diferencia entre linajes. Ambos marcadores darían peso a los resultados y comprobarían mejor las hipótesis.

VIII. CONCLUSIONES

- Mediante el marcador basado en la secuencia de minicírculo se detectó que el 100% (31/31) de las muestras de heces obtenidas de *T. dimidiata* colectadas en el departamento de Chiquimula estaban infectadas con *T. cruzi*.
- Mediante el marcador basado en la secuencia de minicírculo se detectó que el 6.94% (5/72) de las muestras de heces obtenidas de *R. prolixus* colectadas en Chiquimula estaban infectadas con *T. cruzi*, 81.94% (59/72) con *T. rangeli* y 11.11% (8/72) no amplificaron.
- Mediante microsatélites se comprobó que sí existe diferencia significativa génica (Fisher's Exact test, $p = 0.00000$) y genotípica (Fisher's Exact test, $p = 0.00517$) entre las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de diferentes vectores.

IX. RECOMENDACIONES

- Desarrollar una nueva línea de investigación sobre la enfermedad de Chagas que estudie las tasas de infección de *R. prolixus* con *T. rangeli*, así como los efectos epidemiológicos de esta relación.
- Validar mediante el uso de otro marcador molecular la ausencia de *T. cruzi* en las muestras de *R. prolixus* que parecen estar infectadas únicamente con *T. rangeli*.
- Profundizar en el estudio de la diferenciación génica y genotípica mediante microstélites aumentando el número de muestras para que las hipótesis se recomprueben con una base estadística mayor.
- Optimizar y aplicar en Guatemala el marcador basado en la secuencia del miniexón desarrollado para Sur América, ya que éste diferencia linajes de *T. cruzi* y la información obtenida puede ser correlacionada y dar peso a los resultados con microsátélites.

X. LITERATURA CITADA

A. Citas bibliográficas

1. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. 1999. *Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples*. Parasitology. Aug;119 (Pt 2):113-25.
2. Andrade SG 1999. *Trypanosoma cruzi: clonal structure of parasite strain and the importance of principal clones*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Suppl. I): 185-187.
3. Andrade SG, Campos RFM. 1998. *Estrutura clonal das cepas do Trypanosoma cruzi: importância de clones principais*. Rev Soc Bras Med Trop 31 (Supl. II): 21-22.
4. Andrade SG, Magalhães JB. 1997. *Biodemes and zymodemes of Trypanosoma cruzi strains: correlations with clinical data and experimental pathology*. Rev Soc Bras Med Trop 30: 27-35.
5. Andrade SG. 1974. *Caracterização de cepas de Trypanosoma cruzi isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio*. Rev Pat Trop 3: 65-121.
6. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. 1983. *Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 77: 796-799.
7. Araújo IB. 2000. *Estudo Morfobiológico e Izoenzimático de Amostras de Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli Isoladas de Casos Humanos, de Vetores e de Mamíferos Silvestres da Região do Médio e Alto Rio Negro- Amazonas*. MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 76 pp.
8. Ashall F, Yip-Chuck DAM, Luquetti A, Miles M, 1988. *Radiolabel total parasite DNA probe specifically detects Trypanosoma cruzi in mammalian blood*. J. Clin. Microbiol. 26, 576-578.
9. Avila H A, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. 1991. *Polymerase chain reaction amplification of Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease*. Mol. Biochem. Parasitol. 48, 211-222.

10. Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. 1990. *Schizodeme analysis of Trypanosoma cruzi stocks from South and Central America by analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences*. Mol. Biochem. Parasitol. 42:175-188.
11. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, Degraive W, Morel C, Simpson L. 1993. *Detection of Trypanosoma cruzi in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis*. J. Clin. Microbiol. 31, 2421-2426.
12. Bachtrog D, Agis M, Imhof M, Schlotterer C. 2000. *Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-Evidence from Drosophila melanogaster*. Mol Biol Evol 17: 1277-1285.
13. Bennett P. 2000. *Demystified microsatellites*. Mol Pathol. Aug; 53(4):177-83.
14. Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC. 1996. *Polymorphisms in Trypanosoma cruzi: evidence of genetic recombination*. Acta Trop. 61:31-40.
15. Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. 1999 *The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity*. Mol Biochem Parasitol. Nov 30;104(2):219-32.
16. Campbell D. 2002. *Trypanosoma cruzi life cycle, morphology, pathogenesis*. Lecture of molecular parasitology. Usa
17. Carcavallo RU, Giron IG, Jurberg J, Lent H. 1998. *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
18. Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva AA, Pereira CM, Morel CM, Romanha AJ. 1990. *Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of Trypanosoma cruzi strains induced by maintenance in mice*. Acta Trop 47: 35- 45.
19. Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. 1991. *Biological characterization of Trypanosoma cruzi strains from different zymodemes and schizodemes*. Mem Inst Oswaldo Cruz 86: 387-393.

20. Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA. 1996. *Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 54: 418-424.
21. Chagas C. 1909. *Nova tripanosomíase humana*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159-218.
22. Chambers GK, MacAvoy ES. 2000. *Microsatellites: consensus and controversy*. Comp. Biochem. Physiol. 126: 455-476.
23. Chapman MD, Baggaley RC, Godfrey-Fausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, Miles MA. 1984. *Trypanosoma cruzi from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya*. J Protozool 31: 482-486.
24. Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, Anez N, Ramirez JL. *Detection of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences*. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep;10(5):775-9.
25. Clark CG, Pung OJ. 1994. *Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic Trypanosoma cruzi from North America*. Mol. Biochem. Parasitol. 66:175-179.
26. Cuba-Cuba C, Morales N, Fernandez E, Fernández W. 1972. *Hallazgo de Rhodnius ecuadoriensis Lent & León, 1958 infectado por tripanosomas similares a Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 en caseríos del distrito de Cascas, Contumazá, Dpto de Cajamarca, Perú*. Rev Inst Med Trop São Paulo 14: 191-202.
27. Cuba-Cuba C. 1998. *Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. RevSoc Bras Med Trop 31: 207-220.
28. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H, Beverley S. 1995. *Intergenic region typing (IRT) a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 73: 145-155.
29. D'Alessandro A 1972. *New experimental vectors of Colombian Trypanosoma rangeli*. J Med Ent 9: 187-195
30. D'Alessandro A. 1976. *Biology of Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920*. In WHR Lumsden & DA Evans (eds), *Biology of Kinetoplastida*, Vol. 1, Academic Press, London, New York and San

Francisco, p. 327-493

31. D'Alessandro-Bacigalupo A, Gore-Saravia N. 1992. *Trypanosoma rangeli*. In JP Kreier, *Parasitic Protozoa VII*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, p. 1-54.
32. de Sousa MA. 1999. *Morphobiological characterization of Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:205-10.
33. de Souza W. 1999. *A short review on the morphology of Trypanosoma cruzi: from 1909 to 1999*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:17-36.
34. Debrauwere H, Gendrel CG, Lechat S, Dutreix M. 1997 *Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites*. Biochimie 79: 577- 86.
35. Degrave W, Fragoso S, Britto C, Van Heuverswyn H, Kidane G, Cardoso M, Mueller R, Simpson L, Morel C. 1988. *Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27:63-70.
36. Devera R, Fernandes O, Coura JR. 2003. *Should Trypanosoma cruzi be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(1):1-12. Epub 2003 Apr 9.
37. Dorn P, Engelke D, Rodas A. 1999. *Utility of the polymerase chain reaction in detection of Trypanosoma cruzi in Guatemalan ChagasÕ disease vectors*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 740-745.
38. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL,

- Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. 2005. *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science. Jul 15;309(5733):409-15.
39. Englund P, Guilbride DL, Hwa K-Y, Johnson CE, Li C, Rocco LJ, Torri AF 1996. *Kinetoplast DNA: structure and replication*, p. 75-87. In DF Smith & M Parsons (eds), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, IRL Press, New York.
 40. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E. *et al.* 2001. *Trypanosomiasis in the Brazilian Amazon— a mini-exon multiplex PCR to distinguish the major groups of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95:1-3.
 41. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. 1999. *The complexity of the sylvatic cycle of Trypanosoma cruzi in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene*. Parasitology 118: 161-166.
 42. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. 2001. *A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of Trypanosoma cruzi and T. rangeli in the Brazilian Amazon*. Trans R Soc Trop Med Hyg. Jan-Feb;95(1):97-9.
 43. Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbell DA, Zingales B, Coura JR. 1999b. *Populational heterogeneity of Brazilian Trypanosoma cruzi isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Suppl. I): 195-197.
 44. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TB, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. 1998. *Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence*. Am J Trop Med Hyg 58: 807-811.
 45. Fernandes O. 1996. *Análise da Estrutura Primária do Gene de Mini-exon em Diferentes Tripanosomatídeos e sua Utilização como Marcador*

- Molecular*. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 268 pp.
46. Fife, E. 1977. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. In: Kreir, J. (Ed) Parasitic protozoa. Volumen I. Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagelles of fish. Academic Press. USA. 441pp.
 47. Galvao C, Jurberg J, Cunha V, de Mello RP. 1995. *Biology of Triatoma nitida Usinger 1939 in laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae)*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Sep-Oct;90(5):657-63. Portuguese.
 48. Gaunt M, Miles M. 2000. *The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Jul-Aug;95(4):557-65.
 49. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM, 1984. *Minichromosomal repetitive DNA in Trypanosoma cruzi: its use in a high-sensitivity parasite detection assay*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3356-3360.
 50. Greig S, Ashall F, 1987. *Detection of South American trypanosomes in insects using total parasite DNA probes*. Parasitol. Today 3, 375-376
 51. Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, Romanha AJ. 1999. *Characterization of Trypanosoma rangeli strains isolated in Central and South America: an overview*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Mar-Apr;94(2):203-9.
 52. Guhl F, Marinkelle CJ. 1982. *Antibodies against Trypanosoma cruzi in mice infected with T. rangeli*. Ann Trop Med Parasitol 76: 361.
 53. Hadjuk SL, Sabatini RS. 1996. *RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information*, p.134-158. In DF Smith & M Parsons (eds), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, IRL Press, New York.
 54. Harr B, Sangerl B, Schlotterer C 2000. *Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from Drosophila*. Mol Biol Evol 17: 1001-1009.
 55. Hoare C. 1966. *The classification of mammalian trypanosomes*. Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther. 39:43-57
 56. Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
 57. Idury RM, Cardon LR. 1997 *A simple method for automated allele binning in*

- microsatellite markers*. Genome Res. Nov;7(11):1104-9.
58. Kawashita SY, Sanson GF, Fernandes O, Zingales B, Briones MR. 2001. *Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of Trypanosoma cruzi intraspecific evolution*. Mol Biol Evol. Dec;18(12):2250-9.
 59. Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira RL. 1996. *Diversity of Trypanosoma cruzi stocks and clones derived from Chagas disease patients: II. Isozyme and RFLP characterizations*. Exp Parasitol 82: 182-190.
 60. Lauria-Pires L, Santana JM, Tavares FS, Teixeira RL. 1997. *Diversity of Trypanosoma cruzi stocks and clones derived from Chagas disease patients: I. Behavioral characterization in vitro*. Rev Soc Brasil Med Trop 30: 187-192
 61. Lauria-Pires L, Teixeira RL. 1996. *Virulence and pathogenicity associated with diversity of Trypanosoma cruzi stocks and clones derived from Chagas' disease patients*. Am J Trop Med Hyg 55: 304-310.
 62. Lent H, Wygodzinsky P. 1979. *Revision of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease*. Bull Am Mus Nat Hist 163: 520.
 63. Macedo AM, Martins SM, Chiari E, Pena SDJ. 1992. *DNA fingerprinting of Trypanosoma cruzi: a new tool for characterization of strains and clones*. Mol Biochem Parasitol 55: 147-154.
 64. Macedo AM, Pena SDJ. 1998. *Genetic variability of Trypanosoma cruzi: implications for the pathogenesis of Chagas' disease*. Parasitol Today 14: 119-123.
 65. Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC, Steindel M. 2001. *Differential susceptibility of triatominae of the genus Rhodnius to Trypanosoma rangeli strains from different geographical origins*. Int J Parasitol 31: 631-633
 66. Macina RA, Araujo S, Reyes M, Sanchez DO, Basombrio MA, Montamat EE, Solari A, Frasch ACC. 1987. *Trypanosoma cruzi isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes*. Mol. Biochem. Parasitol. 25, 45-53
 67. Marcilla AM, Bargues D, Ramsey JM, Magallongastelum E, Salazar-Schettino

- PM, Abad-Franch F, Dujardin J, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2001. *The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease*. Mol. Phylogenet. Evol. 18:136-142.
68. Marinkelle CJ. 1968. *Triatoma dimidiata capitata, a natural vector of Trypanosoma rangeli in Colombia*. Rev Biol Trop 15: 203-205.
69. Marroquín L, Juárez JA. 2003. *Informe Final: Reunión Internacional para el Establecimiento de Criterios de Certificación de Eliminación de Rhodnius prolixus, Antecedentes de la eliminación de Rhodnius prolixus en Guatemala*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
70. Metzgar D, Bytof J, Wills C. 2000. *Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA*. Genome Res. 10: 72-80.
71. Miles M, Cibulskis RE. 1986. *Zymodeme characterization of Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today 4:94-97.
72. Miles MA, Apt W, Widmer G, Pova MAM, Schofield CJ. 1984. *Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of Trypanosoma cruzi stocks from Chile*. Trans R Soc Trop Med Hyg 78: 526-535
73. Miles MA, Cedillos RA, Pova M, Souza AA, Prata A, Macedo V. 1981. *Do radically dissimilar Trypanosoma cruzi (Zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form of Chagas' disease?*. Lancet i: 1338-1340.
74. Miles MA, De Souza AA, Pova M. 1981. *Chagas disease in the Amazon Basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera:Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil*. J Med Entomol 18: 266-278.
75. Miles MA, De Souza AA, Pova MM. 1981. *Mammal tracking and nest location in Brazilian forest with an improved spool-and-line device*. J Zool Lond 195: 331-347.
76. Miles MA, Lanzan SM, de Souza AA, Pova DG. 1980. *Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for strain identification*. Trans R Soc Trop Med Hyg 74: 221-242.
77. Miles MA, Pova M, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. 1981. *Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of Trypanosoma cruzi zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil*.

- Trans R Soc Trop Med Hyg 75: 667-674.
78. Miles MA, Souza AA, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. 1978. *Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil*. Nature 272: 819-821.
 79. Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 1977. *The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of Trypanosoma cruzi circulating independently in a rural area of Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg 71: 217-225.
 80. Miles MA. 1979. *Transmission cycles and the heterogeneity of Trypanosoma cruzi in Amazonian forest*. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. 2, Academic Press, London, New York, San Francisco, p. 117-196.
 81. Monroy C, Bustamante DM, Rodas A, Rosales R, Mejia M, Tabaru Y. 2003. *Geographic distribution and morphometric differentiation of Triatoma nitida Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 37-43.
 82. Morel C, Chiari E, Camargo E, Mattei D, Romanha A, Simpson L. 1980. *Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6810-6814.
 83. Morgante, M., Hanafer, M. and Powell, W. 2002. *Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes*. Nat. Genet. 30 (2002) 194-200.
 84. Nakagawa, J., Juárez J, Nakatsuji K, Akiyama T, Hernandez G, Macal R, Flores C, Ortiz M, Marroquin L, Bamba T, Wakai S. 1999. 2005. *Geographical characterization of the triatomine infestations in north-central Guatemala*. Ann Trop Med Parasitol. Apr;99(3):307-15.
 85. Neiva A, Lent H. 1936. *Notas y comentarios sobre triatomídeos. Lista de especies en sua distribuição geográfica*. Rev. De Entom Rio de Janeiro 6(2);fasc 2.
 86. Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ. 1998. *Probing the genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3776-3780.

87. Oliveira RP, Melo AIR, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. 1999. *The population structure of Trypanosoma cruzi: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Suppl. I): 65- 70.
88. Paz-Bailey G, Monroy C, Rodas A, Rosales R, Tabaru R, Davies C, Lines J. 2002. *Incidence of Trypanosoma cruzi infection in two Guatemalan communities*. Trans R Soc Trop Med Hyg. Jan-Feb;96(1):48-52.
89. Ponce C. 1999. *Elimination of the vectorial transmission of Chagas disease in Central American countries: Honduras*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:417-8.
90. Povoá MM, De Souza AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA. 1984. *Chagas disease in the Amazon Basin IV. Host records of Trypanosoma cruzi zymodemes in the States of Amazonas and Rondônia, Brazil*. Ann Trop Med Parasitol 78: 479-487.
91. Reichnow E. 1933. *Sobre la Existencia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala*. Publicación de la Dirección General de Sanidad Pública, Guatemala, 24 pp.
92. Rivera P. 2003. *Identificación y caracterización de microsatélites polimórficos en Trypanosoma cruzi*, Universidad del Valle de Guatemala.
93. Romanha AJ. 1982. *Heterogeneidade Isoenzimática em Trypanosoma cruzi*. PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110 pp.
94. Schlötterer C. 1998. *Genome evolution: are microsatellites really simple sequences?* Curr Biol 1998;8:R132-4.
95. Schofield CJ, Dujardin JP. 1997. *Chagas disease vector control in Central America*. Parasitol Today 13: 141-144.
96. Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. 1997. *Inhibition of efficient PCR amplification of Borrelia burgdorferi DNA in blood fed Ticks*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1997. 56:339-342.
97. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell, Zingales B. 1996. *DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83: 141-152.

98. Stothard JR, Frame IA, Miles MA. 1999. *Genetic diversity and genetic exchange in Trypanosoma cruzi: dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94(Suppl. 1):189-193.
99. Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA. 1998. *On the molecular taxonomy of Trypanosoma cruzi using riboprinting*. Parasitology. 117:243-247
100. Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. 1989. *Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease*. Mol. Biochem. Parasitol. 33, 205-214.
101. Tabaru Y, Monroy C, Rodas A, Mejia M, Rosales R. 1999. *The geographical distribution of vectors of Chagas disease and population at risk of infestation in Guatemala*. Med Entomol Zool 50: 3-8.
102. Takano-Lee M, Edman JD. 2002 *Lack of manipulation of Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by Trypanosoma cruzi*. J Med Entomol. Jan;39(1):44-51.
103. Tibayrenc M, Ayala F. 1988. *Isoenzyme variability in Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomic and epidemiological significance*. Evolution 42:277-292.
104. Tibayrenc M, Brenière SF. 1988. *Trypanosoma cruzi: major clones rather than principal zymodemes*. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 249-255.
105. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. 1990. *A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas, and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2414-2418.
106. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F. 1986. *Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure*. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 83:115-119.
107. Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Goncalves R, Guhl F, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA. 2005. *Molecular characterisation of Trypanosoma rangeli strains isolated from Rhodnius ecuadoriensis in Peru, R. colombiensis in Colombia and R. pallenscens in Panama, supports a co-*

- evolutionary association between parasites and vectors. Infect Genet Evol. Mar;5(2):123-9.*
108. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Moreira MCV, Filho GB, Pena SDJ. 2000. *Genetic characterization of Trypanosoma cruzi from tissues of patients with chronic Chagas disease. Am J Pathol 156: 1805-1809.*
 109. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. 1999. *Species specific detection of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. Mar 15;72(2):203-12.*
 110. Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. 1994. *The kinetoplast DNA from Trypanosoma rangeli contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. Mol. Biochem. Parasitol. 67, 245-253.*
 111. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sanchez N. 1988. *Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre Trypanosoma cruzi y T. rangeli en el intestino del vector Rhodnius prolixus. Rev. Bras. Biol. 48, 577-587.*
 112. Wierdl M, Dominska M, Petes TD. 1997. *Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. Genetics 146:769-79.*
 113. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1991. *Control of Chagas' Disease. WHO Reportes Técnicos, Series No. 811. Organización Mundial de la Salud. Geneva. Suiza.*
 114. Xu X, Peng M, Gang Z. 2000. *The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. Nat Gen 24: 396-399.*
 115. Zeledón R. 1981. *El Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) y su Relación con la Enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 146 pp.*
 116. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. 1998. *Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. InterJ Parasitol 28: 105-112.*

B. Citas de internet

1. Applied Biosystems. (2000) *3100, Conversion Program Notes*
 - <http://www.appliedbiosystems.com/support/software/3100/conversion.cfm>
2. Applied Biosystems. (2003) “3730 Genetic Analyzer, Gene Mapper Training”
 - <http://awcmee.massey.ac.nz/Data/3730GMTrainingMar2003.pdf>
3. Brands, S.J. (comp.) 1989-2007. *The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands.
 - <http://taxonomicon.taxonomy.nl>.
4. Brands, S.J. (comp.) 1989-2007. *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands.
 - <http://sn2000.taxonomy.nl>
5. CDC 2003, Enfermedad de Chagas, Division of Parasitic Disease
 - http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht_chagas_disease_Spanish.htm
6. European Bioinformatics Institute.
 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>
7. INGEBI 2001 Molecular biology of Chagas Disease laboratory.
 - <http://Therion.dna.uba.ar/labchagas/espaniol.htm>
8. Integrated DNA Technologies
 - <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>
9. National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
10. Organización Panamericana de la Salud, Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana)
 - <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/chagas.htm>
11. Raymond M, Rousset F. 2004 “Genepop” Laboratorio de genética y ambiente, Montpellier, France, proporcionado por la Escuela de Ciencias Biomédicas, Universidad de Tecnología Curtin, Australia
 - <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/index.html>
12. Rodriguez EM, Briceño L, Chiurillo MA, Mosca W, Campos Y. 2004. “Tripanosomiasis americana, aspectos teóricos”. Curso latinoamericano sobre enfermedades

infecciosas, instituto de Biomedicina, UNU-BIOLAC, Venezuela.

- http://www.biolac.unu.edu/PDF/BioM_Tripanosomiasis.pdf

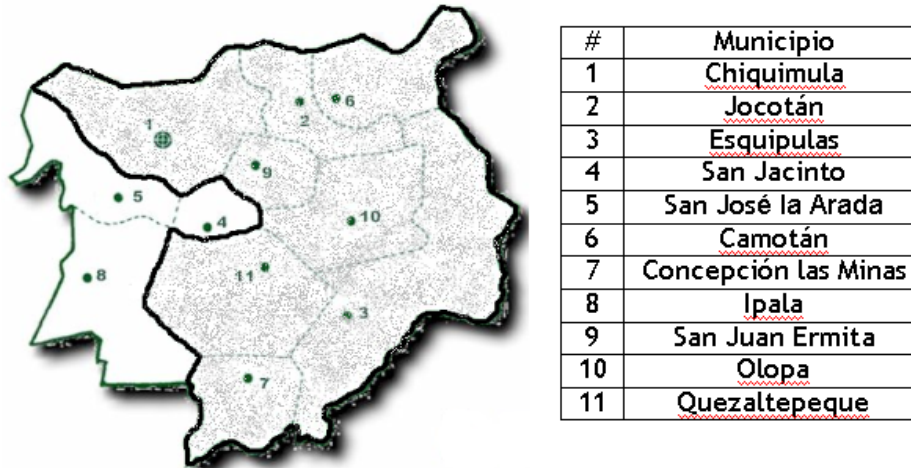
13. Simpson Lab. 2007. On line Course on Molecular Parasitology-UCLA. USA.

- <http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/>

XI. APÉNDICES

A. Recursos disponibles para esta tesis

Figura 36: Mapa del departamento de Chiquimula en donde se señalan los municipios muestreados.



(Adaptado del Ministerio de Economía de Guatemala)

Cuadro 15: Listado de muestras de los departamentos de Chiquimula.

Muestra	Lote	Municipio	Localidad	Especie	Infección glándula rectal
1	20-030-3-R-49	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+++
2	20-048-28-R-4	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+++
3	20-076-92-R-8	Jocotán	Aldea Oregano	<i>R. prolixus</i>	+++
4	20-086-56-R-2	San Juan Ermita	Aldea Quequexque	<i>R. prolixus</i>	+++
5	20-148-11-D-1	Quezaltepeque	Aldea Salfate	<i>T. dimidiata</i>	+++
6	20-086-67-D-2	San Juan Ermita	Aldea Quequexque	<i>T. dimidiata</i>	+++
7	20-087-46-D-3	San Juan Ermita	Aldea Quequexque	<i>T. dimidiata</i>	+++
8	20-091-8-D-2	San Juan Ermita	Aldea Río Arriba	<i>T. dimidiata</i>	++
9	20-182-7-R-38	Chiquimula	Caserío El Rincón de Santa Bárbara	<i>R. prolixus</i>	++
10	20-076-92-R-13	Jocotán	Aldea Oregano	<i>R. prolixus</i>	++
11	20-046-39-R-2	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	++
12	20-094-9-D-1	San Juan Ermita	Aldea Encuentros	<i>T. dimidiata</i>	+
13	20-097-36-D-1	San Juan Ermita	Aldea Chanco	<i>T. dimidiata</i>	+
14	20-194-4-D-1	Chiquimula	Aldea El Chilar	<i>T. dimidiata</i>	+
15	20-030-3-R-51	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+
16	20-030-5-R-9	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+
17	20-046-39-R-6	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+
18	20-048-28-R-1	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+
Continuación: Cuadro 15					
19	20-048-28-R-15	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+
20	20-048-28-R-22	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+
21	20-004-47-R-1	Olopa	Aldea El Carrizal	<i>R. prolixus</i>	+++

22	20-022-12-R-1	Camotán	Caserío El Quebracho	<i>R. prolixus</i>	
23	20-021-8-R-5	Camotán	Caserío El Quebracho	<i>R. prolixus</i>	++
24	20-159-10-D-4	Quezaltepeque	Aldea Limón	<i>T. dimidiata</i>	+
25	20-159-10-D-3	Quezaltepeque	Aldea Limón	<i>T. dimidiata</i>	+
26	20-001-19-R-2	Olopa	Aldea El Carrizal	<i>R. prolixus</i>	+
27	20-021-8-R-2	Camotán	Caserío El Quebracho	<i>R. prolixus</i>	+
28	20-048-28-R-25	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+
29	20-049-102-R-18	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
30	20-076-93-R-11	Jocotán	Aldea Oregano	<i>R. prolixus</i>	+
31	20-004-47-R-3	Olopa	Aldea El Carrizal	<i>R. prolixus</i>	+/2
32	20-129-5-R-4	Olopa	Aldea La Prensa	<i>R. prolixus</i>	+/2
33	20-130-10-R-3	Olopa	Aldea La Prensa	<i>R. prolixus</i>	+/2
34	20-030-3-R-3	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
35	20-030-3-R-5	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
36	20-030-3-R-6	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
37	20-030-3-R-11	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
38	20-030-3-R-18	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
39	20-030-3-R-23	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
40	20-030-3-R-25	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
41	20-030-3-R-31	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
42	20-030-3-R-37	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
43	20-030-3-R-38	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
44	20-030-3-R-44	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
45	20-030-3-R-48	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
46	20-030-3-R-52	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
47	20-030-3-R-59	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
48	20-030-3-R-62	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
49	20-030-3-R-64	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
50	20-030-6-R-3	Camotán	Caserío El Limar	<i>R. prolixus</i>	+/2
51	20-035-10-R-4	Camotán	Aldea El Tular	<i>R. prolixus</i>	+/2
52	20-046-54-R-1	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+/2
53	20-046-54-R-3	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+/2
54	20-046-54-R-5	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+/2
55	20-046-39-R-1	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+/2
56	20-046-39-R-10	Camotán	Aldea El Anicillo	<i>R. prolixus</i>	+/2
57	20-048-11-R-1	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
58	20-048-28-R-5	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
59	20-048-28-R-6	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
60	20-048-28-R-8	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
61	20-048-28-R-23	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
62	20-048-28-R-24	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
63	20-048-28-R-26	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
64	20-048-28-R-24	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
65	20-048-28-R-30	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2

Continuación: Cuadro 15

66	20-048-28-R-32	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
67	20-049-102-R-2	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+
68	20-049-102-R-11	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
69	20-048-10-R-2	Camotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
70	20-076-92-R-12	Jocotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
71	20-076-93-R-2	Jocotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
72	20-076-93-R-5	Jocotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2

73	20-076-93-R-7	Jocotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
74	20-076-93-R-8	Jocotán	Dos Quebradas	<i>R. prolixus</i>	+/2
75	20-079-32-R-3	Jocotán	Aldea Colmenas	<i>R. prolixus</i>	+/2
76	20-182-7-R-42	Chiquimula	Caserío El Rincón de Santa Bárbara	<i>R. prolixus</i>	+/2
77	20-091-8-D-3	San Juan Ermita	Aldea Río Arriba	<i>T. dimidiata</i>	+/2
78	20-091-11-D-1	San Juan Ermita	Aldea Río Arriba	<i>T. dimidiata</i>	+/2
79	20-150-5-D-12	Quezaltepeque	Caserío Pata de Buey	<i>T. dimidiata</i>	+/2
80	20-159-7-D-1	Quezaltepeque	Aldea Limón	<i>T. dimidiata</i>	+/2
81	20-224-8-D-1	Concepción Las Minas	Aldea La Cañada	<i>T. dimidiata</i>	+/2
82	20-226-6-D-10	Concepción Las Minas	Aldea Socorro	<i>T. dimidiata</i>	+/2
83	20-226-7-D-6	Concepción Las Minas	Aldea Socorro	<i>T. dimidiata</i>	+/2
84	20-223-2-D-10	Concepción Las Minas	Aldea La Cañada	<i>T. dimidiata</i>	+/2
85	20-095-14-D-2	San Juan Ermita	Aldea Encuentros	<i>T. dimidiata</i>	+/2
86	20-098-15-D-1	San Juan Ermita	Aldea Chanco	<i>T. dimidiata</i>	+/2
87	20-098-15-D-2	San Juan Ermita	Aldea Chanco	<i>T. dimidiata</i>	+/2
88	20-086-67-D-3	San Juan Ermita	Aldea Quequexque	<i>T. dimidiata</i>	+/2
89	20-159-10-D-2	Quezaltepeque	Aldea Limón	<i>T. dimidiata</i>	N
90	20-135-99-D-2	Quezaltepeque	Caserío El Comun	<i>T. dimidiata</i>	+/2
91	20-155-30-D-1	Quezaltepeque	Aldea Río Grande	<i>T. dimidiata</i>	+/2
92	20-158-2-D-1	Quezaltepeque	Aldea Limón	<i>T. dimidiata</i>	+/2
93	20-148-21-D-1	Quezaltepeque	Aldea Salfate	<i>T. dimidiata</i>	+/2
94	20-149-155-D-1	Quezaltepeque	Aldea Salfate	<i>T. dimidiata</i>	++
95	20-223-2-D-7	Concepción Las Minas	Aldea La Cañada	<i>T. dimidiata</i>	+
96	20-353-10-D1	Esquipulas	Valle de Dolores	<i>T. dimidiata</i>	+/2
97	20-353-10 D2	Esquipulas	Valle de Dolores	<i>T. dimidiata</i>	+/2
98	20-355-11 D1	Esquipulas	Caserío Chiromay	<i>T. dimidiata</i>	+/2
99	20-027-6 R2	Camotan		<i>R. prolixus</i>	+
100	20-021-6 R5	Camotan		<i>R. prolixus</i>	++
101	20-020-8 R15	Camotan	El Quebracho	<i>R. prolixus</i>	+/2
102	20-020-8 R18	Camotan	El Quebracho	<i>R. prolixus</i>	+/2
103	20-076-92-R-9	Jocotán	Aldea Oregano	<i>R. prolixus</i>	+/2

B. Protocolo para geles de poliacrilamida

1. PAGE. Preparación de geles de poliacrilamida 29:1 al 10%:

1. Equipos, materiales y reactivos:

Equipo:

- .1 Cámara electroforética vertical de BioRad modelo Mini-PROTEAN II:
- .2 Bomba de vacío
- .3 Fuente de poder
- .4 Agitador

Materiales:

- .5 Pipetas de 5, 10 y 25mL
- .6 Micropipetas y puntas de 10 y 50 uL
- .7 Papel Parafilm
- .8 Esponja
- .9 Kimwipes: Pañuelo desechable de alta calidad para que no deje mota en los vidrios.
- .10 Beaker de 20 mL
- .11 Filtro: Nalgene 0.2
- .12 Hielo finamente picado
- .13 Jeringa
- .14 Recipiente para colocar el hielo al rededor de la cámara
- .15 Agitador magnético

Reactivos:

- .16 Agua dd
- .17 Alconox 1%: Detergente aniónico especial para uso en laboratorio.
- .18 Repel Silane, Dimethyldichorosilane solution, 2% w/v, in octamethyl-cyclotetrasiloxane. Code No. 17-1332-01, Pharmacia Biotech
- .19 Etanol al 95%
- .20 Buffer TBE (Tris, Borato y EDTA) 10X: hacer referencia preparación en cálculos.
- .21 acrilamida: Bio-Rad Pureza electroforesis, >99.9%, catálogo 161-0107, 1kg. También puede usarse, Sigma, >99.9%, A-3553.
- .22 Bisacrilamida: Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0201, 50g
- .23 Buffer 6X:
Azul de bromofenol: Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0404, 10g.
Xilen cianol FF: Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0423, 25g.
Sucrosa: Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0720
Ficoll: type 400, Pharmacia
- .24 Marcador estándar de peso molecular:
1kb, Gibco, Life Technologies, catálogo 15615-024
100bp, Promega, catálogo G2101
- .25 TEMED Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0800, 5mL.
- .26 APS al 25%: Bio-Rad, pureza electroforesis, catálogo 161-0700, 10g. Hacer referencia sección de cálculos para su preparación.

2. Procedimiento:

.1 Preparación de las placas:

1. Seleccionar las placas, una grande y una pequeña. Asegurarse que estas no tengan rayones o rajaduras especialmente en el borde inferior ya que se corre el riesgo de derramar el gel.
2. Lavar las placas de ambos lados con una solución alconox al 1%, usando una esponja que se utilice únicamente para placas no adheridas. Quitar el jabón con agua dd y secar con pañuelos desechables pequeños a modo que no quede mota. Junto con las placas lavar los peines y espaciadores.
3. Con un pañuelo desechable, distribuir uniformemente y con movimientos horizontales y verticales 50uL de Repel Silane (Tóxico). Los 50uL alcanza para ambos lados de la placa. Dejar reposar 10 minutos.

4. Eliminar el exceso de Repel Silane lavando con etanol al 95% sin frotar. Secar con pañuelos desechables.
5. Quitar el etanol al 95% lavando con agua dd, no frotar, secar con pañuelos desechables.
- .2 Ensamblaje de las placas, este instructivo se basó en la cámara electroforética vertical de BioRad modelo Mini-PROTEAN II:
 1. Elegir la base o soporte de placas que se usará. Colocar el vidrio grande en contacto con la base, el vidrio pequeño va enfrente del grande, luego se introducen los espaciadores (deben ser del mismo grosor) a modo que separen el vidrio grande del pequeño.
 2. Asegurarse que ambas placas queden completamente alineadas del borde inferior, para eso se puede ayudar con el soporte de cargar el gel o usando una superficie completamente plana. Los espaciadores deben ir justo en las orillas, para esto puede usar la tarjeta de alineación. Apretar los tornillos de la base en cruz y teniendo cuidado de no romper las placas de vidrio. Al finalizar se debe tomar la base, darle vuelta y revisar que todo haya quedado correctamente alineado de lo contrario volver a proceder como en este inciso antes de agregar el gel.
 3. Colocar la base armada con las placas en el soporte para cargar el gel. Se puede poner papel Parafilm en el extremo inferior a modo de hacer un empaque. Asegurarse que el sistema esté armado sobre una superficie plana ya que evita que se derrame el gel y que se genere una matriz desnivelada, puede usar un nivelador de burbuja. Esto último podría generar la distorsión del perfil de las bandas.
 4. Por último, usando una pipeta verter la solución del gel entre las placas. Dejar polimerizar teniendo como control la solución que quedó en beaker donde fue preparado, alrededor de 30 minutos. Para asegurar mayor reproducibilidad respecto al tamaño del poro, se debe dejar polimerizar por dos horas.
 5. Se puede agregar una capa de butanol-agua o isopropanol líquido saturado con agua para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización. El alcohol puede agregarse con una pipeta pasteur cuidando que no se mezcle con el gel. Nota: El alcohol puede atacar químicamente el plástico acrílico lo que hace que se ponga opaco y que luego dificulte la observación de los pozos. Cuando haya polimerizado eliminar el alcohol con agua dd, no dejarlo más de una hora porque podría deshidratar la superficie del gel.
- .3 Preparación del gel, se recomienda preparar un máximo de 3 geles:
 1. Se usan aproximadamente 6mL de solución para una gel pequeño de 7cm X 8 cm se puede preparar un poco más de lo que se va a necesitar. Preferiblemente el gel debe quedar a temperatura ambiente, por lo que si es necesario hay que permitir que los reactivos almacenados en frío alcancen esta temperatura antes de mezclarlos.
 2. Mezclar las cantidades necesarias de agua, acrilamida al 30% (tóxico) y TBE 10X. Hacer referencia a sección 10.4: “Resumen de reactivos para la preparación de un gel al 10%” y a la sección 11.4 “Cálculos, Preparación de gel a partir de reactivos stock”.
 3. Desgasificar de 20 a 30 minutos usando el filtro y la bomba de vacío. Verter cuidadosamente la solución dentro del filtro para evitar hacer burbujas. El filtro puede usarse alrededor de 5 veces, se recomienda colocar la fecha de cada uso para llevar un control del mismo. La desgasificación sirve para eliminar el oxígeno.
 4. Vaciar el contenido del filtro dentro del mismo beaker en donde fue preparada la solución, cuidando de que resbale por las paredes para que la desgasificación sea efectiva. Agregar 1uL de Temed y un uL de APS 25% por cada mL de gel preparado. Mezclar suavemente y con una pipeta introducirlo entre las placas de vidrio, colocar el peine, dejar polimerizar. Si no se va usar inmediatamente entonces guardarlo a 4°C y colocarlo en la superficie buffer TBE 0.5X para que no se deshidrate.
- .4 Resumen de reactivos para la preparación de un gel (7cm X 8 cm) al 10%

1 gel sin mL extra (6mL):	2 geles con 1 mL extra (13mL):
3.70 mL agua dd	8.02 mL agua dd
2 mL de stock acrilamida al 30%	4.33 mL de stock acrilamida al 30%
0.30 mL de TBE 10X	0.65 mL de TBE 10X
desgasificar 20 minutos	desgasificar 20 minutos
6 uL de APS al 25%	13 uL de APS 25%
6 uL de Temed	13 uL de Temed
3 gel con 2 mL extra (20mL):	4 geles con 2 mL extra (26mL):

- | | | |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | 12.34 mL agua dd | 16.04 mL agua dd |
| | 6.66 mL de stock acrilamida al 30% | 8.66 mL de stock acrilamida al 30% |
| | 1.0 mL de TBE 10X | 1.30 mL de TBE 10X |
| | desgasificar 30 minutos | desgasificar 30 minutos |
| | 20 uL de APS al 25% | 26 uL de APS al 25% |
| | 20 uL de Temed | 26 uL de Temed |
5. Ensamblaje de la cámara, procedimiento basado en la cámara electroforética BioRad modelo Mini-PROTEAN II.
1. Montar la base para gel en la base interna de la cámara. Asegurarse que quede fija para que no se derrame el buffer interno. Si solo se desea correr una gel, colocar en el otro lado una base para gel sin vidrios. Si se coloca únicamente un gel el tiempo de corrida disminuye.
 2. Agregar buffer TBE 0.5X en la cámara externa a modo de que bañe el borde inferior del gel, aproximadamente 1 cm. Luego agregar buffer TBE 0.5X en la cámara interna cubriendo completamente los pozos, el nivel debe llegar aproximadamente entre los bordes superiores de los dos vidrios. Colocar un agitador magnético en la cámara externa.
 3. Con una jeringa, sacar las burbujas que queden entre los pozos y lavarlos con el mismo buffer TBE 0.5X mediante ciclos de succión y expulsión, sin picar con la aguja el gel. Esto elimina la poliacrilamida que no polimerizó y permite que la muestra corra si obstáculos.
 4. Colocar la cámara dentro de un recipiente que contenga hielo para mantener la temperatura baja durante toda la corrida. El recipiente con la cámara se coloca sobre un agitador.
6. Procedimiento para cargar y correr el gel.
1. Las mezclas de muestra y buffer 6X se hacen sobre papel Parafilm. Primero se pueden colocar en el papel puntos de buffer y luego ir mezclándolos con la muestra. No se deben colocar demasiados puntos para evitar que estos se sequen. Pipetear de dos a 3 veces para que se homogenice pero hacerlo suavemente para no dañar las muestras.
 2. Cargar el 1uL de marcador estándar de peso molecular + 1uL de buffer 6X o 5uL de la preparación de marcador de pares de bases, hacer referencia a sección 11: "Cálculos". De ser posible se recomienda cargar el marcador en ambos extremos del gel para tener un mejor control de la corrida.
 3. Cargar 5uL de muestra + 1uL de buffer 6X, la mezcla se hace sobre papel Parafilm. Las muestras y los reactivos deben mantenerse en hielo. Hacer un esquema del contenido de cada pozo.
 4. Es importante señalar que la cámara ya ensamblada deberá estar ubicada sobre una superficie totalmente plana y nivelada. Evitar el movimiento de la cámara y no detener el procedimiento mientras se cargan los pozos para que todas las muestras corran al mismo tiempo y tengan las mismas condiciones.
 5. Cerrar la cámara, encender el agitador magnético y conectarla a la fuente de poder. Ajustar el voltaje (Volts), potencia (Watts) o corriente (mAmps) de la siguiente manera: en el caso de la fuente de poder EC600, marca EC Apparatus Corporation: presionar "set", mover la perilla de cada variable a modo de establecer las condiciones constantes, si se desea que las propiedades queden en modo variable, se lleva la aguja hasta el extremo derecho. Presionar "start" y esperar a que las condiciones se estabilicen, en base a las escalas seleccionadas apuntar las mediciones iniciales. La escala se selecciona presionando cualquiera de los botones que están bajo la aguja.
 6. Durante el proceso se evidenciarán dos fuentes de corrida de diferente color y distancia de migración. Ambos colores, azul oscuro y azul claro corresponden a los colorantes azul de bromofenol y xilene cianol, respectivamente, que conforman el buffer 6X. El xilene cianol en geles de poliacrilamida al 8% migra de manera similar a un fragmento de ADN de 160 pb, mientras que el azul de bromofenol a esta misma concentración de poliacrilamida es equivalente a un fragmento de 45bp.
 7. Dejar correr durante el tiempo estipulado para cada procedimiento específico o hasta que observe que el buffer 6X llega al final del gel. El tiempo de corrida depende del tamaño y tipo de bandas que se desean observar.
 8. Al terminar el tiempo de corrida, apuntar las condiciones finales, apagar la fuente de poder y desensamblar la cámara. El buffer TBE 0.5X de la cámara interna y externa puede ser usado únicamente dos veces.
 9. Desensamblar el sistema de electroforesis, el buffer puede ser guardado para usarlo una vez más o desechado en el lavadero. Sacar la base interna y remover la base del gel. Destornillar y quitar los vidrios a la vez.

10. Despegar el gel de las placas de vidrio cuidando de que no se rompa. Se puede quitar un vidrio levantando lentamente uno de los espaciadores a modo de separar. Diferenciar el inicio y final del gel y en el caso de que se corrieran dos geles, diferenciar uno del otro, se puede hacer mediante diferentes cortes en las esquinas o en las pestañas que separan los pozos. Luego separar el gel del otro vidrio mediante la presión de la solución de ácido acético (reactivo de la tinción plata) al caer sobre ella. Si la tinción se hace en base a plata entonces colocar de 1 a 2 geles en 200mL de una solución de ácido acético al 10% por 20 minutos como mínimo o 24 horas como máximo; esto fijará las bandas pero si es demasiado tiempo se lavan.
11. Los vidrios, espaciadores y tanque deberán ser levados con agua dd y secados con pañuelos desechables. No se debe usar alcohol para limpiar las partes plásticas del equipo porque se dañan los componentes acrílicos.
12. Cuando se desee hacer una limpieza más profunda de las placas entonces dejarlas toda la noche remojando en una solución de hidróxido de sodio al 10%. También se puede poner por 30 minutos o más en una solución de un ácido fuerte como ácido crómico o ácido sulfúrico.

3. Cálculos:

1. Preparación de 500mL de Buffer TBE (Tris Base, A. Bórico y EDTA) 10X:

$$\left(\frac{500 \text{ mL TBE}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) \left(\frac{108 \text{ g Tris Base}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) = 54 \text{ g Tris Base}$$

$$\left(\frac{500 \text{ mL TBE}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) \left(\frac{55 \text{ g Acido Bórico}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) = 27.5 \text{ g Acido Bórico}$$

$$\left(\frac{500 \text{ mL TBE}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) \left(\frac{40 \text{ mL EDTA } 0.5\text{M}}{1000 \text{ mL TBE}}\right) = 20 \text{ mL EDTA } 0.5\text{M}$$

Se disuelven las sales en aproximadamente 350 mL de H₂O dd y luego se agrega el EDTA, dejar mezclando de 2 a 3 horas para que no se precipite fácilmente. Por último aforar a 500mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Para preparar buffer TBE 0.5X, partir de la solución stock de 10X, ejemplo para obtener 500mL:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10X)(V_1) = (0.5X)(500\text{mL})$$

$$V_1 = \frac{(0.5X)(500\text{mL})}{10X} = 25\text{mL}$$

C1= concentración inicial (Stock) C2= concentración final (dilución)
V1 = volumen inicial (stock) V2= volumen final de la dilución

Tomar 25 mL de buffer 10X y mezclar con 475mL de agua.

2. Solución stock de Poliacrilamida:Bis

Para aislamiento de microsatélites (80 a 300 pares de bases) como punto de partida se recomienda usar geles al 12% de proporción acrilamida:bis 29:1.

Por ejemplo, se desea preparar 50 mL de stock al 30% a una proporción 24:1 (24%+1%=25%)

Primero se debe identificar la proporción porcentual entre poliacrilamida:Bis

$$\left(\frac{30\% \text{ stock}}{25\% \text{ stock}}\right) \left(\frac{24\% \text{ poliacrilamida}}{25\% \text{ stock}}\right) = 28.8\% \text{ poliacrilamida}$$

$$\left(\frac{30\% \text{ stock}}{25\% \text{ stock}}\right) \left(\frac{1\% \text{ bisacrilamida}}{25\% \text{ stock}}\right) = 1.2\% \text{ bisacrilamida}$$

$$28.8\% + 1.2\% = 30\%$$

Segundo paso es calcular los gramos necesarios de reactivo según proporción:

$$\left(\frac{50 \text{ mL stock}}{100 \text{ mL stock}}\right) \left(\frac{28.8 \text{ g poliacrilamida}}{100 \text{ mL stock}}\right) = 14.4 \text{ g poliacrilamida}$$

$$\left(\frac{50 \text{ mL stock}}{100 \text{ mL stock}}\right) \left(\frac{1.2 \text{ g bisacrilamida}}{100 \text{ mL stock}}\right) = 0.6 \text{ g bisacrilamida}$$

Usar guantes, mascarilla, bata y lentes. Trabajar bajo campana de extracción. En tibiair agua dd y disolver 14.4 g de acrilamida + 0.6 g de bisacrilamida, aforar a 50mL. Envolver el recipiente que contiene la solución con papel aluminio, a modo de mantenerlo oscuro. Almacenar a 4°C.

- .3 Preparación de APS al 25 %.
 - .4 Mezclar 0.125g de APS + 500 uL de agua dd. Alicuotar 15 uL y guardar a -20°C.
- Preparación de gel a partir de reactivos stock:
Ejemplo para preparar 13mL de gel al 10%
Buffer TBE 0.5X:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10X)(V_1) = (0.5X)(13 \text{ mL de gel})$$

$$V_1 = \frac{(0.5X)(13 \text{ mL de gel})}{10X} = 0.65 \text{ mL TBE } 10X$$

Acrilamida:bis 10%, recomendado para fragmentos de 80 a 300pb: La concentración puede reducirse (8%) o aumentarse (16%) para fragmentos más grandes o más pequeños, respectivamente.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(30\%)(V_1) = (10\%)(13 \text{ mL de gel})$$

$$V_1 = \frac{(10\%)(13 \text{ mL de gel})}{30\%} = 4.33 \text{ mL acrilamida : bis } 30\%$$

C1= concentración inicial (Stock) C2= concentración final (dilución)
V1 = volumen inicial (stock) V2= volumen final de la dilución

Agua dd:

$$13 \text{ mL de gel} - 4.33 \text{ mL poliacrilamida : bis } 30\% - 0.65 \text{ mL TBE } 10X = 8.02 \text{ mL agua dd}$$

1uL de por APS cada mL de gel y 1uL de TEMED por cada mL de gel.

2. Revelado con tinción plata (basado en optimización Alejandra Castillo, 2002):

1. Equipos, materiales y soluciones:
Equipo y materiales:
 - .1 Agitador
 2. Desecador modelo 543, BioRad, Hércules, CA

3. Papel filtro, BioRad, Hércules, CA
4. Papel celofán, BioRad, Hércules, CA

Soluciones

5. Agua dd
6. Solución fijadora: 200mL de ácido acético glacial al 10%
7. Solución para colorear: 200mL de AgNO_3 al 0.15% y 800 uL de formaldehído al 37%.
8. Solución para desarrollar a 4°C: 200mL de NaCO_3 , 800uL de formaldehído al 37% y 40uL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01g/mL.
9. Solución desecadora: 100mL contiene 47mL de agua dd, 3mL glicerol, 40mL metanol y 10mL ácido acético glacial.

2. Procedimiento:

1. Preparar la solución desarrolladora sin agregar formaldehído al 37% ni el tiosulfato de sodio. Colocar a 4°C.
2. Enfriar a 4°C 200 mL de agua dd.
3. Preparar la solución de coloración, sin agregar el formaldehído al 37%, almacenar fuera de la luz.
4. Después de fijar el gel, se recolecta el fijador para ser utilizado en el último paso de la tinción.
5. Usando el mismo recipiente en donde se hizo la fijación, se lava el gel tres veces con 200mL de agua destilada y desionizada con 2 minutos de agitación por lavado. Uso de agua menos pura puede resultar en niveles dispares de coloración de fondo. Se usa agua destilada fresca en cada lavado.
6. Durante el último lavado, agregar los 800uL de formaldehído al 37% en la solución para colorear, homogenizar por 30 segundos o menos, guardar fuera de la luz hasta su uso.
7. Transferir la solución de colorear al gel y agitar durante 30 minutos en oscuro.
8. Terminados los 30 minutos descartar la solución de colorear y luego agregar agua dd a 4°C por no más de 20 segundos.
9. Descartar el agua y agregar a la solución de desarrollar el formaldehído al 37% y el tiosulfato de sodio a 0.01g/mL.
10. Agregar la solución de desarrollar hasta que las bandas se vean.
11. Detener la coloración agregando la solución fijadora que almacenó.
12. Lavar el gel tres veces con agua dd
13. Tomar fotografía
14. Empapar un hoja de papel filtro y celofán en solución desecadora.
15. Colocar el gel entre papel filtro y celofán y secarlo.

C. Estrategias para evitar la contaminación del PCR anidado.

1. Limpiar con etano al 70% y UV por 15 minutos al empezar
2. La polimeraza nunca está en contacto con alguno de los reactivos o las muestras.
3. Las muestras nunca están en contacto con los controles positivos.
4. Colocar el control negativo tanto en la posición uno como en la última.
5. Colocar el aceite en los tubos durante la primera reacción.
6. Cambiar agua y aceite en cada reacción.
7. Esterilizar con UV todos los materiales que se usan entre la primera y segunda reacción.
8. Preparar el MX2 en la campana del I₂115 y agregarlo al MX1 en la campana del I₂114.
9. Se agrega MX2 al producto de la primera reacción, en lugar de producto de la primera reacción a MX2.
10. Para agregar la segunda reacción se usa la pipeta “sólo ADN”.
11. Limpiar lámpara con etanol al 70% cada 2 semanas.

D. Reglas de Selección de picos reales en los programas GeneScan y Genotyper.

1. Deben poseer más de 50 unidades de fluorescencia.
2. Deben ser múltiplos de la repetición del microsatélite.
3. Se removerán los picos menores a 100 pares de bases puesto que corresponden a dímero o tetrámero de cebador.
4. Se removerán los picos precedidos por uno más alto, con una distancia entre picos entre 1.6pb.
5. Se removerán los picos seguidos o antecidos por uno más grande, con una diferencia de tamaño según repetición y diferencia de intensidad menor a 75%, tomando al pico principal como el 100%.
6. Se tomaran como “stutter” aquellos que van en disminución alrededor del pico principal y son múltiplos de la repetición.

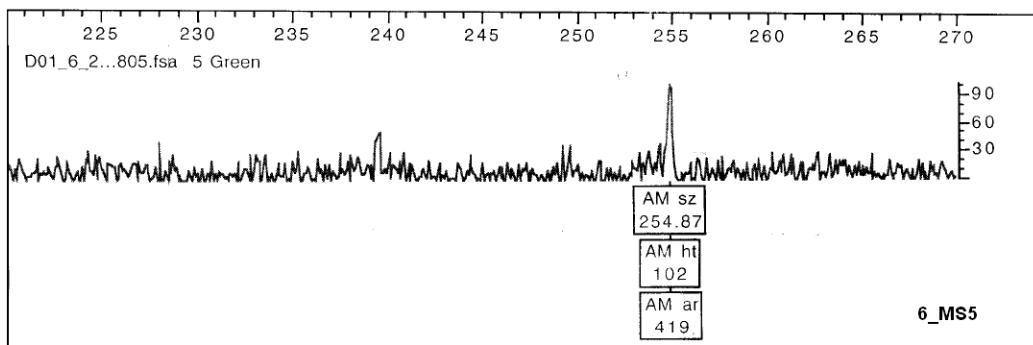
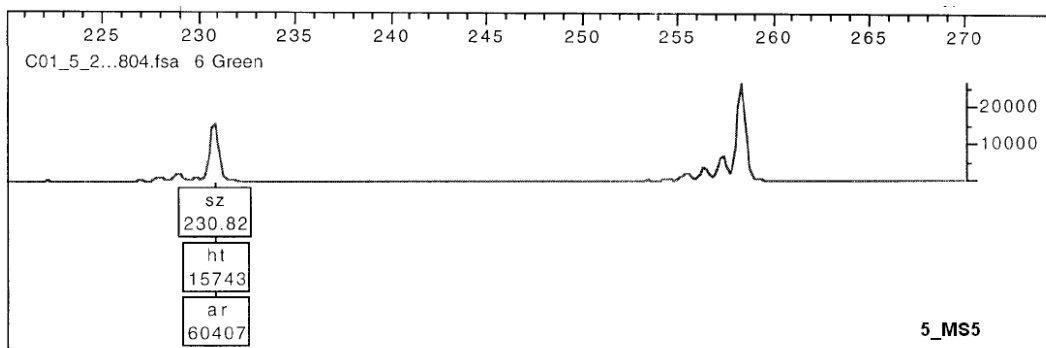
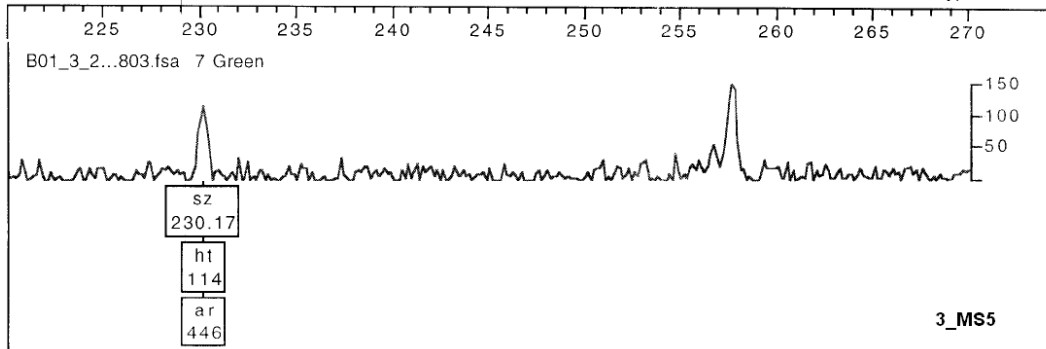
E. Listado de muestras según lugar de análisis.

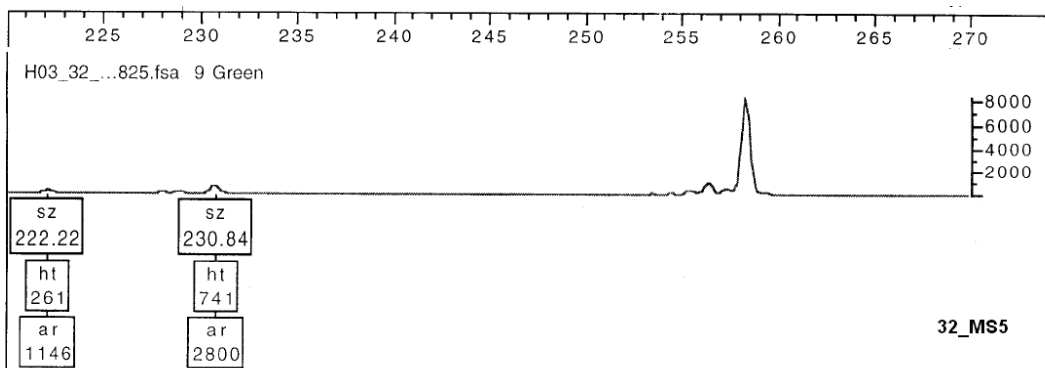
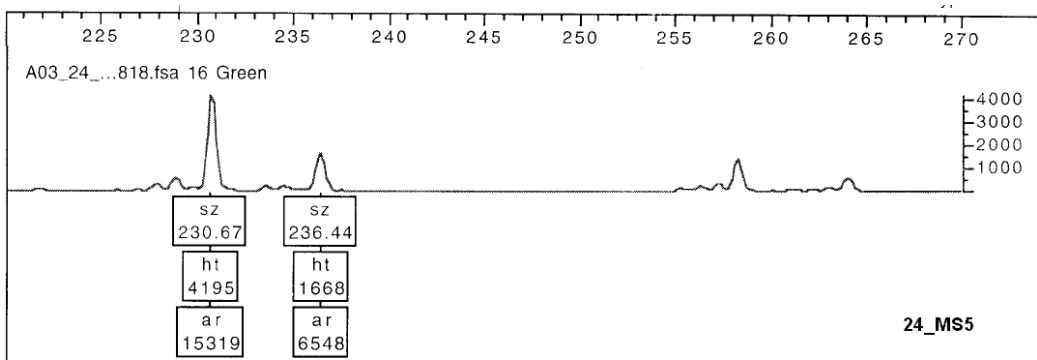
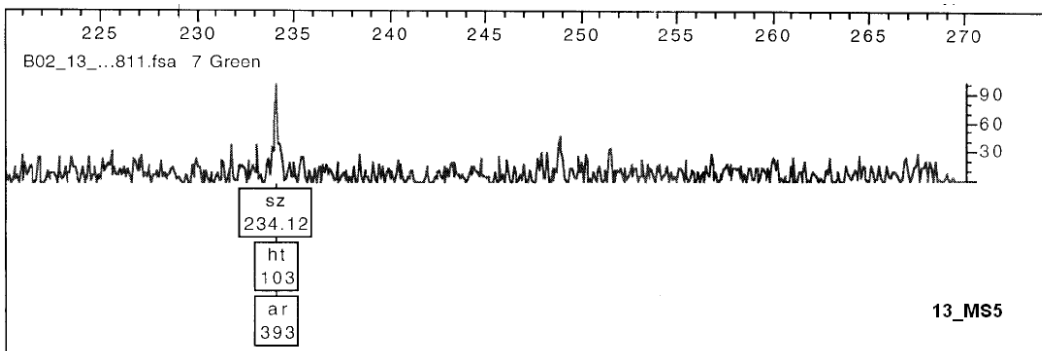
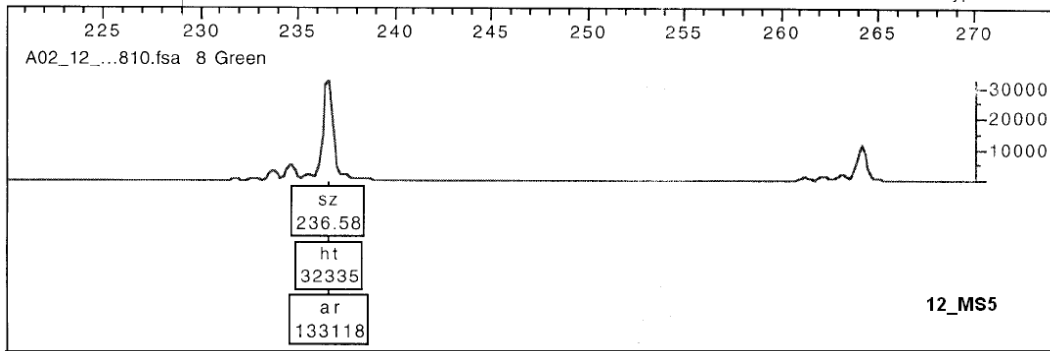
Cuadro 16: Listado de muestras según lugar en donde se realizó el análisis por electroforesis capilar. Los cuadros en blanco corresponden a Alelos nulos.

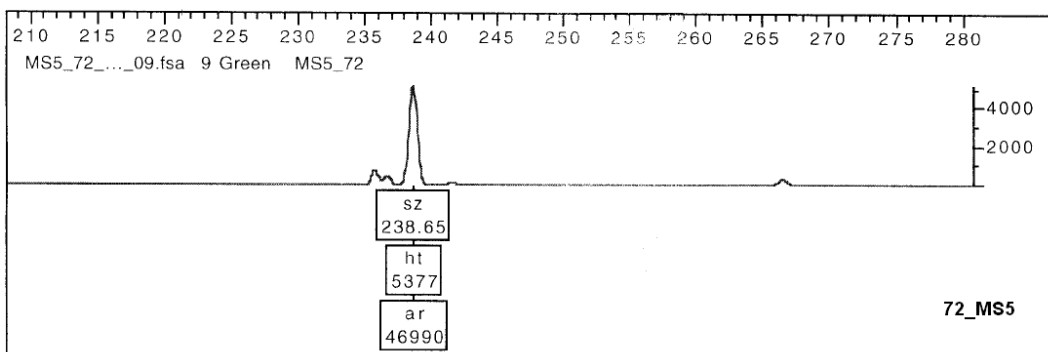
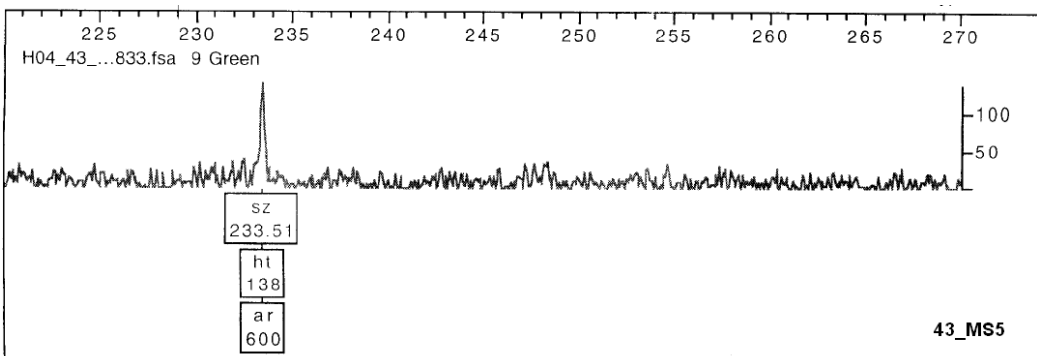
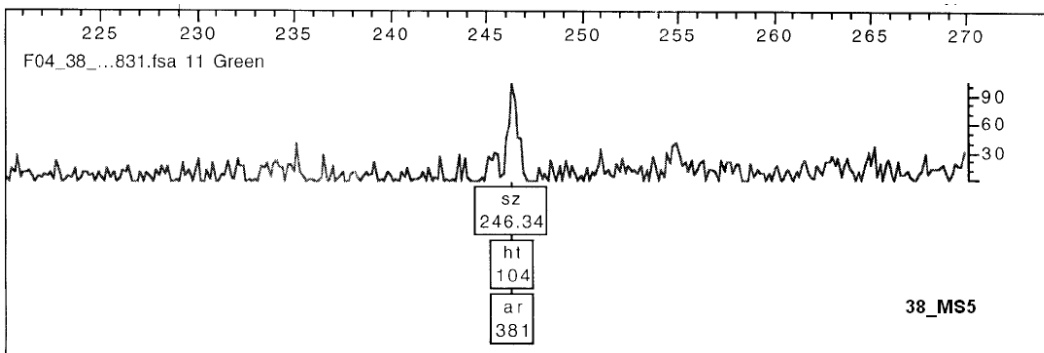
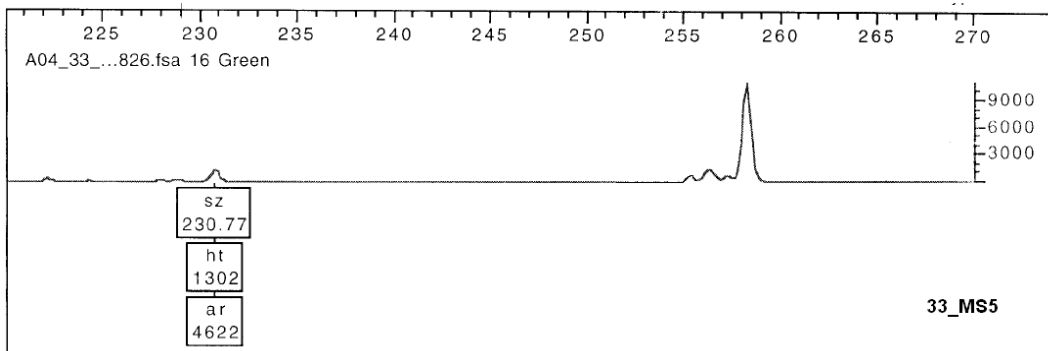
Muestra	Lote	MS3	MS5
1	20-030-3-R-49	Atlanta	
3	20-076-92-R-8		Arizona
5	20-148-11-D-1	Atlanta	Arizona
6	20-086-67-D-2	Atlanta	Arizona
7	20-087-46-D-3	Atlanta	
12	20-094-9-D-1	Arizona	Arizona
13	20-097-36-D-1	Arizona	Arizona
14	20-194-4-D-1	Atlanta	
19	20-048-28-R-15	Arizona	
24	20-159-10-D-4	Arizona	Arizona
25	20-159-10-D-3	Arizona	
32	20-129-5-R-4		Arizona
33	20-130-10-R-3		Arizona
38	20-030-3-R-18		Arizona
43	20-030-3-R-38	Arizona	Arizona
71	20-076-93-R-2	Arizona	
72	20-076-93-R-5	Arizona	Atlanta
73	20-076-93-R-7	Arizona	Atlanta
78	20-091-11-D-1	Atlanta	
80	20-159-7-D-1	Arizona	
81	20-224-8-D-1	Arizona	Atlanta
82	20-226-6-D-10	Arizona	Arizona
83	20-226-7-D-6	Arizona	Arizona
84	20-223-2-D-10	Arizona	Arizona
86	20-098-15-D-1	Arizona	Arizona
88	20-086-67-D-3	Arizona	Atlanta
89	20-159-10-D-2	Arizona	Arizona
92	20-158-2-D-1	Arizona	
94	20-149-155-D-1		Arizona
96	20-353-10-D1	Arizona	Arizona
97	20-353-10 D2	Arizona	Arizona
98	20-355-11 D1	Arizona	Arizona
102	20-020-8 R18	Arizona	
103	20-076-92-R-9		Arizona

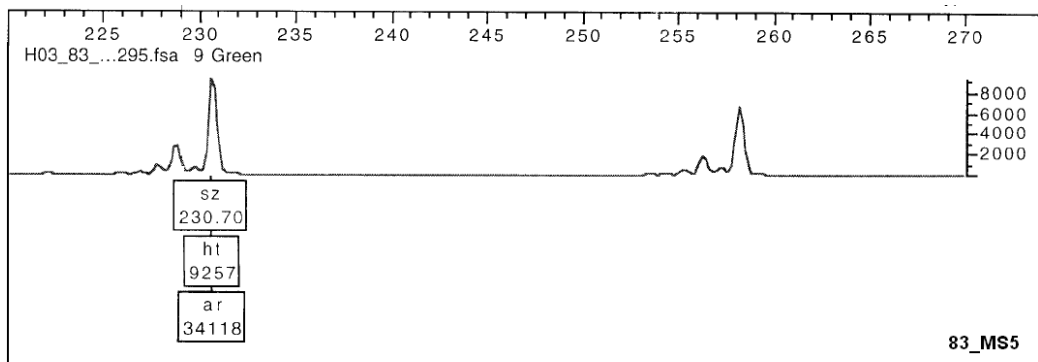
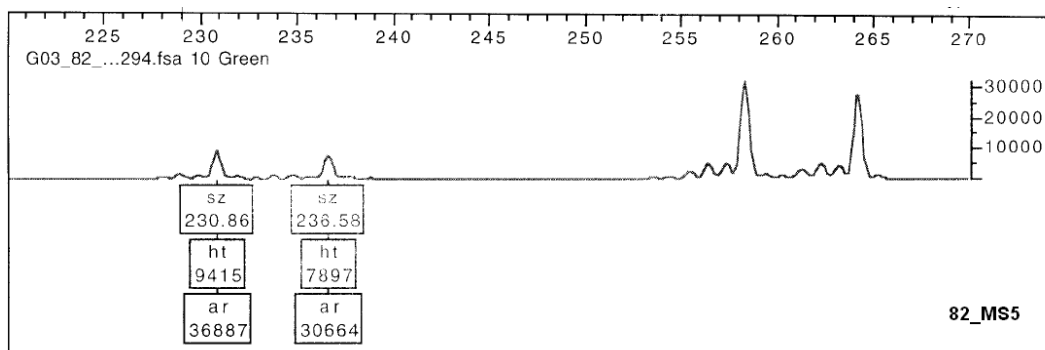
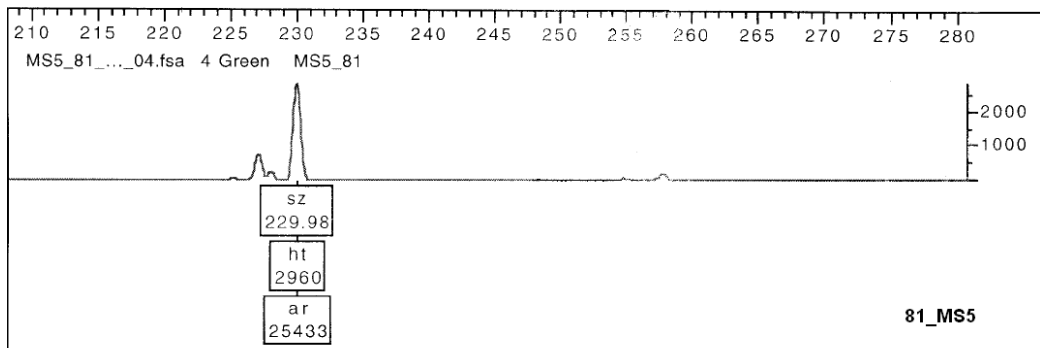
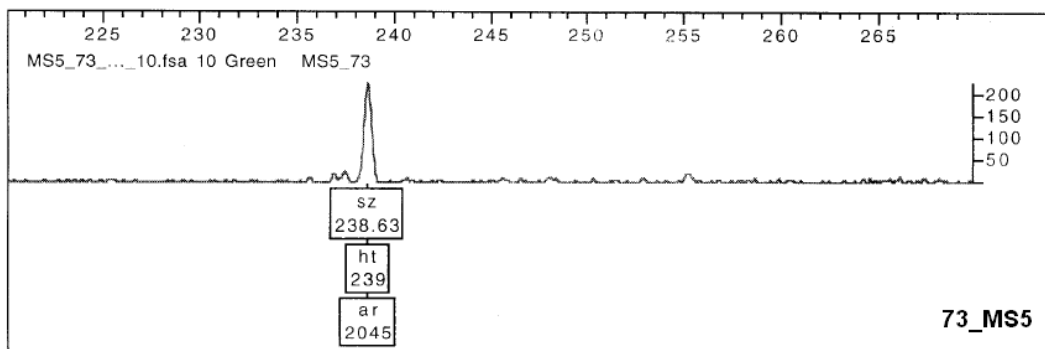
F. Electroferogramas de las muestras positivas

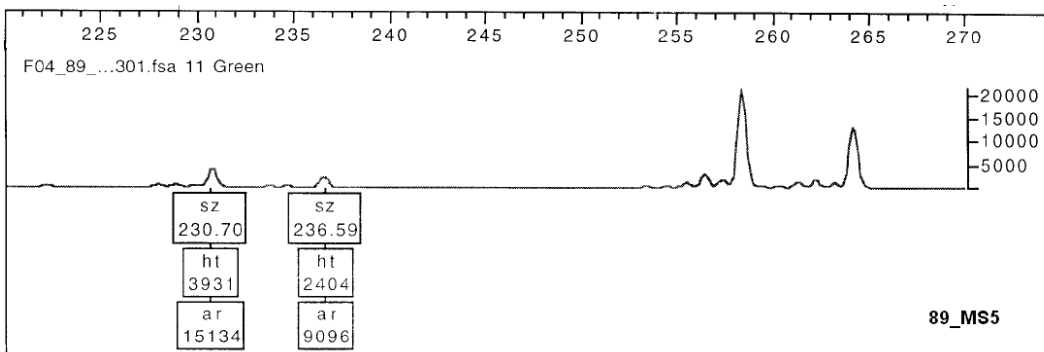
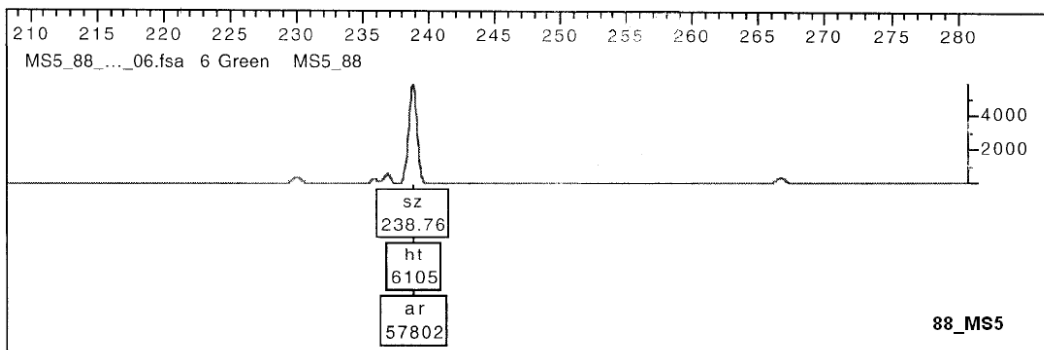
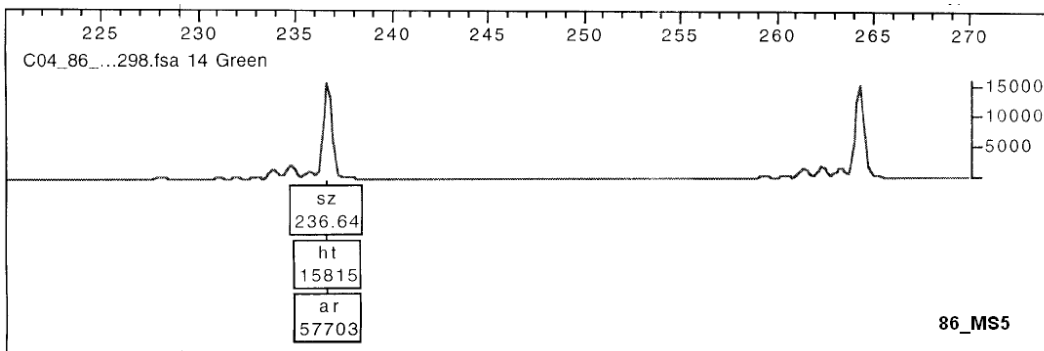
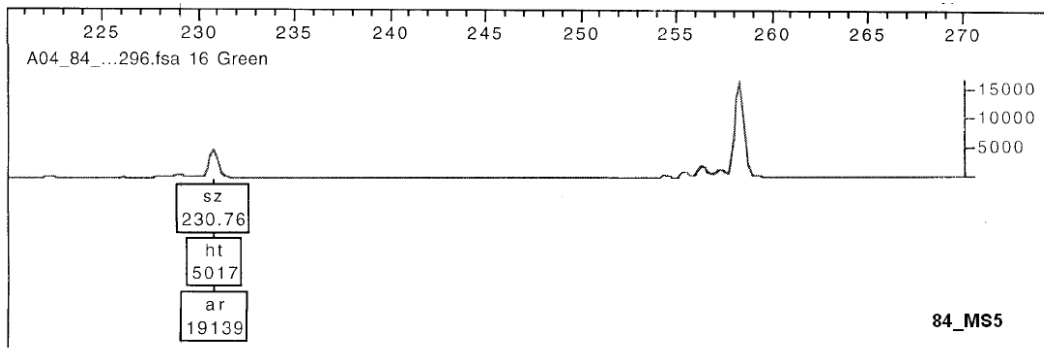
1. Locus MS5

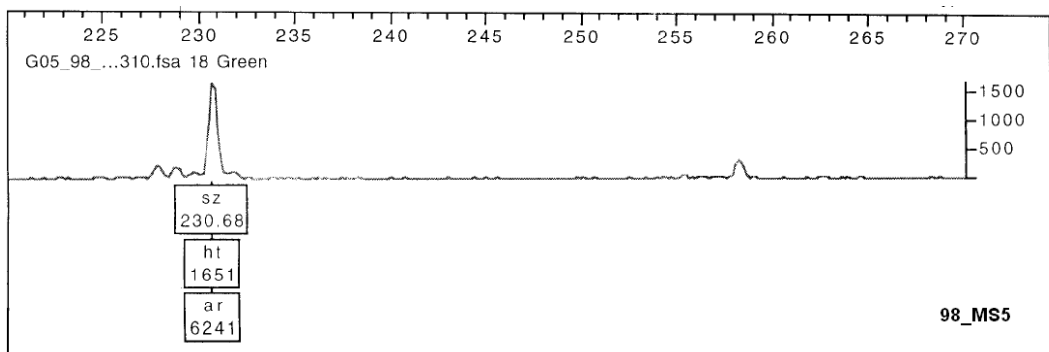
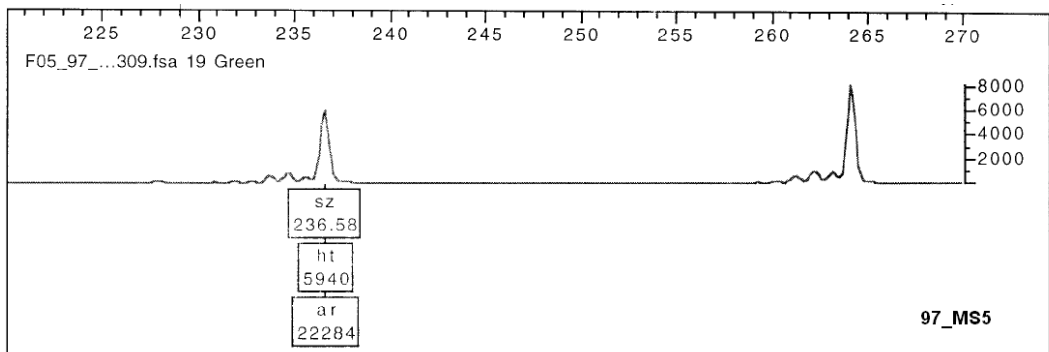
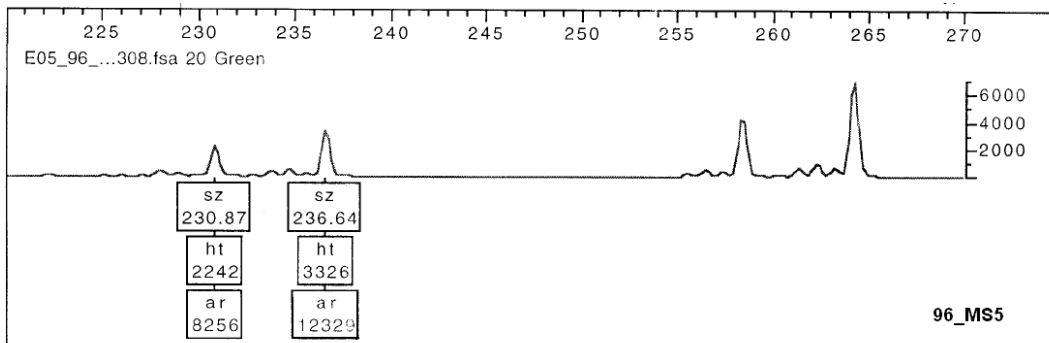
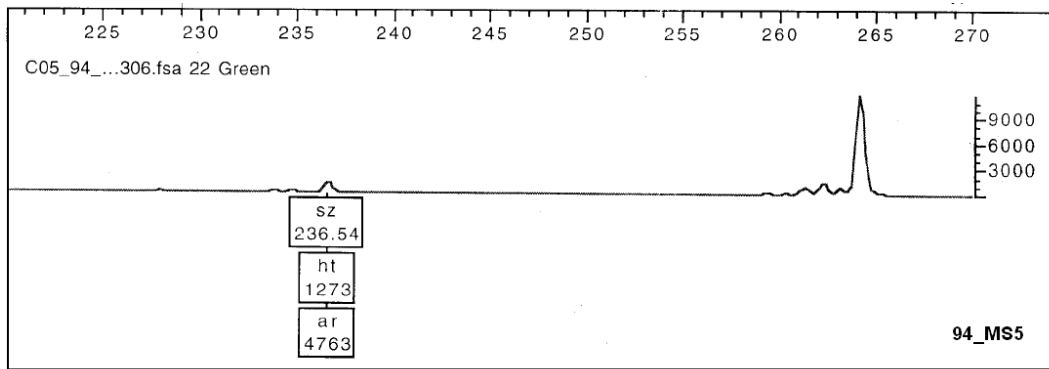


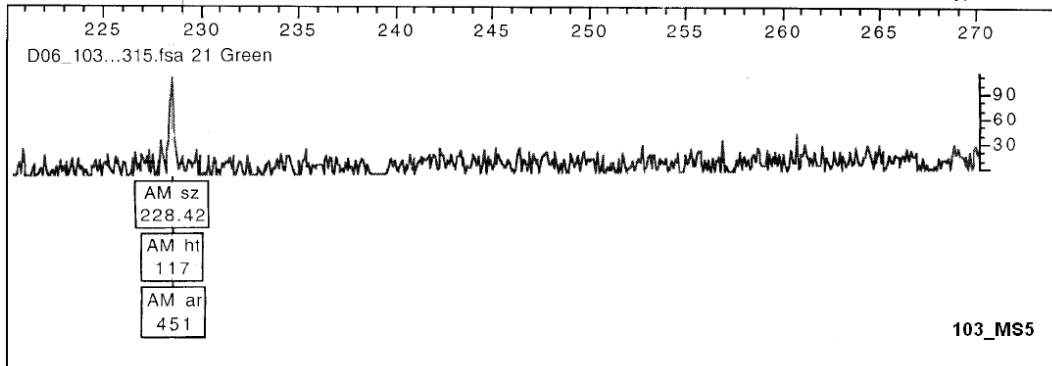




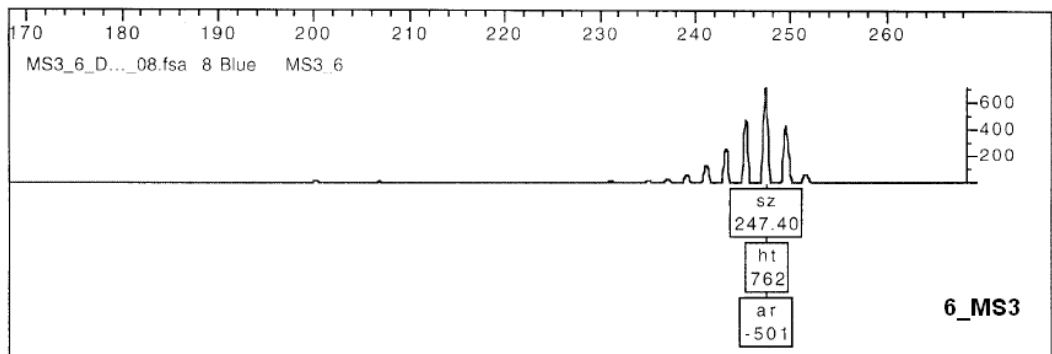
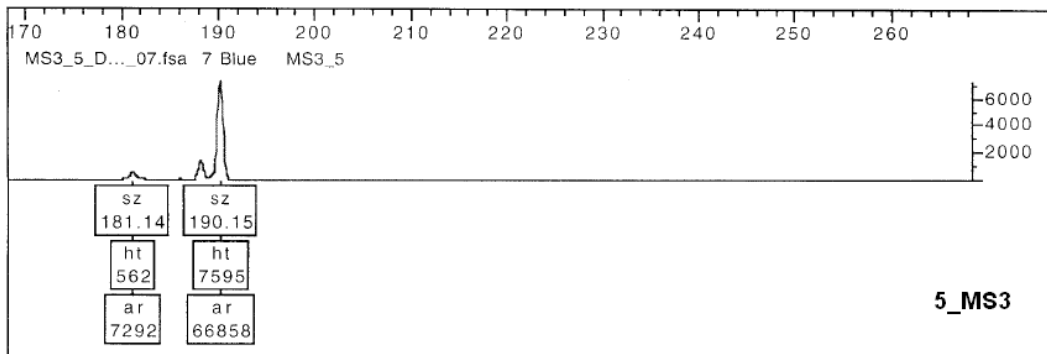


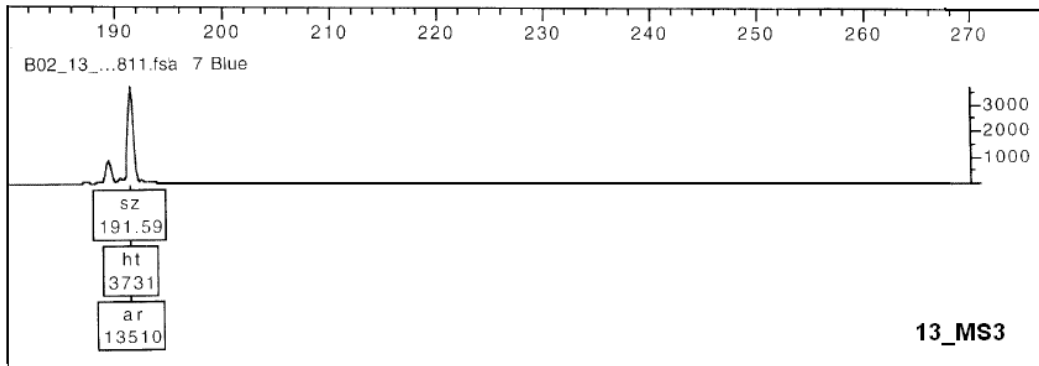
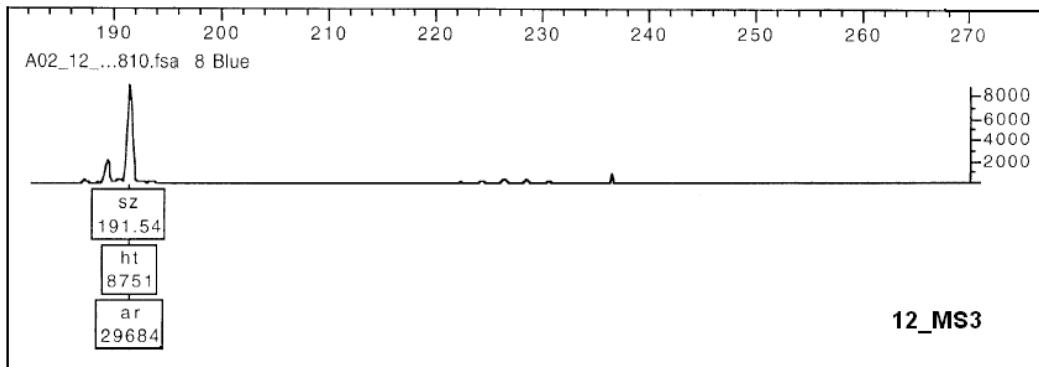
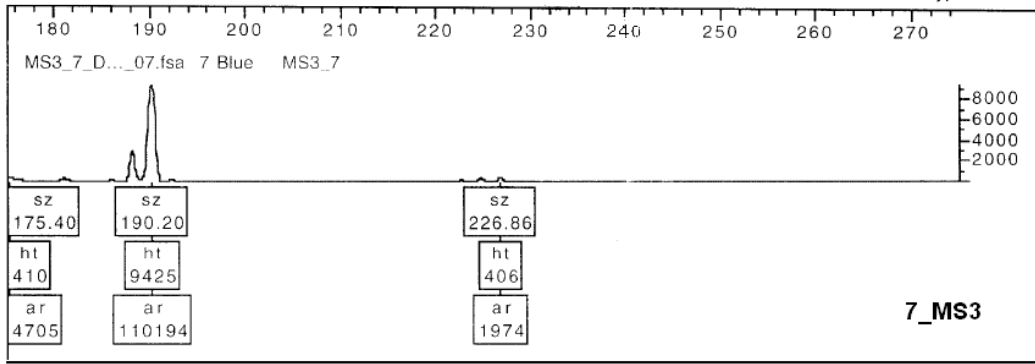


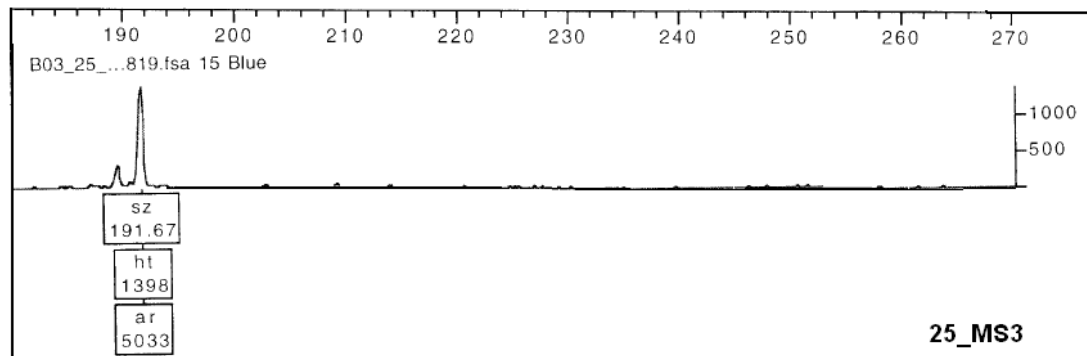
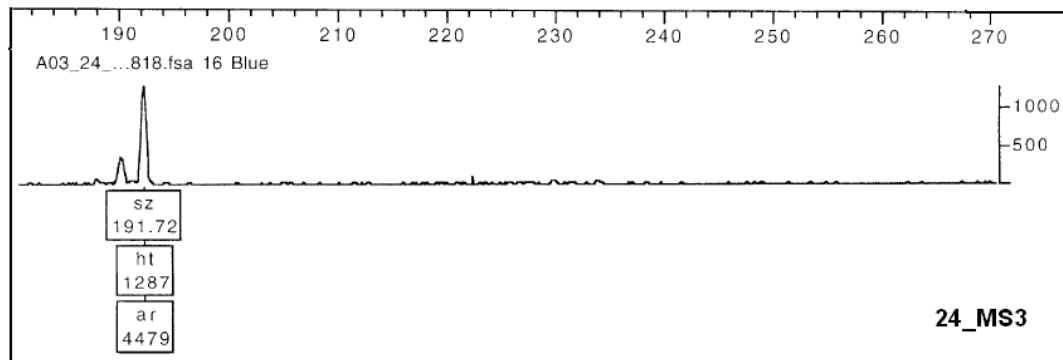
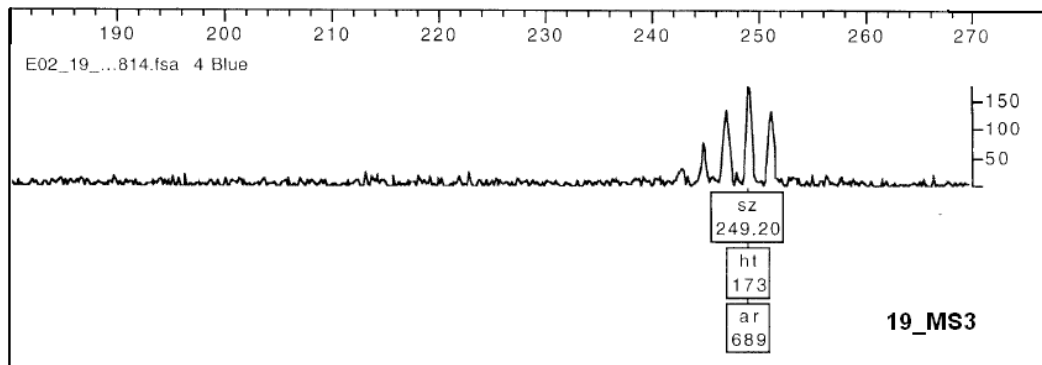
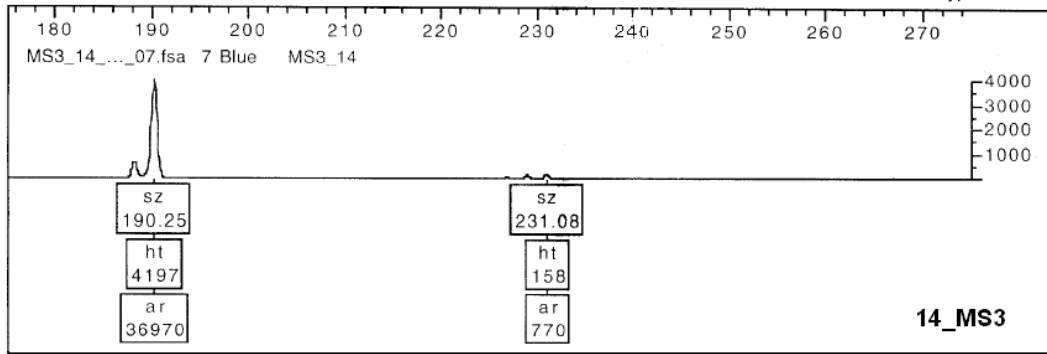


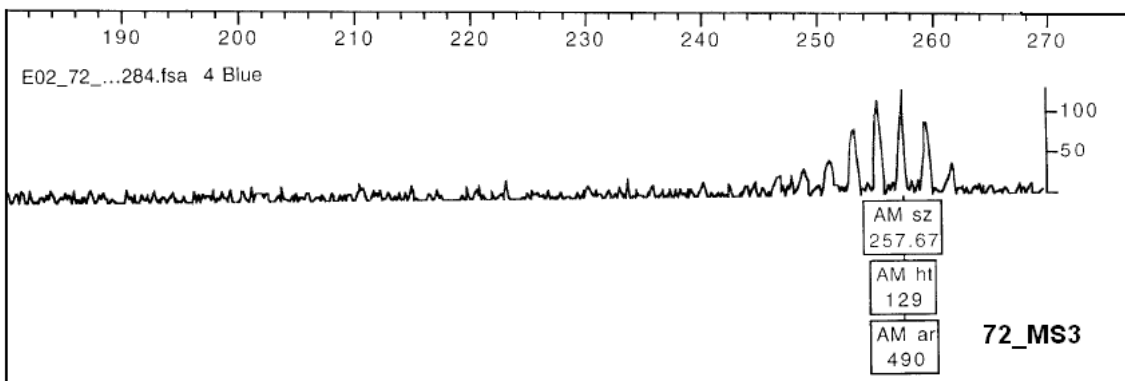
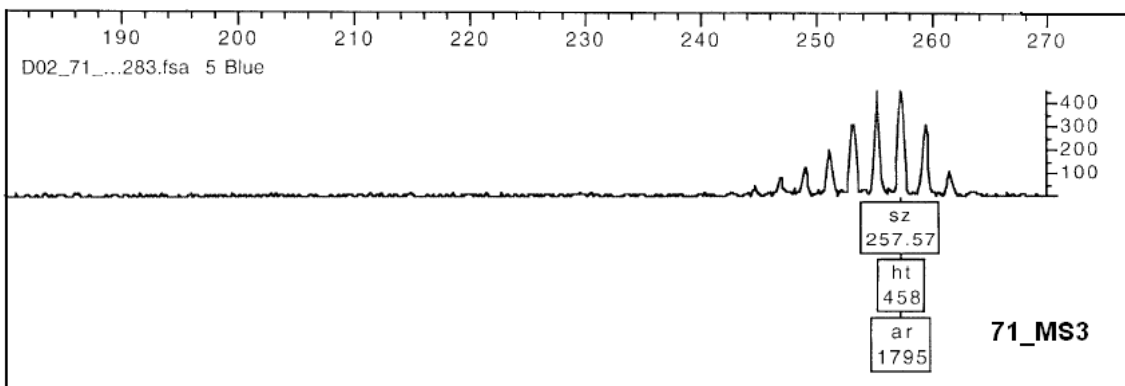
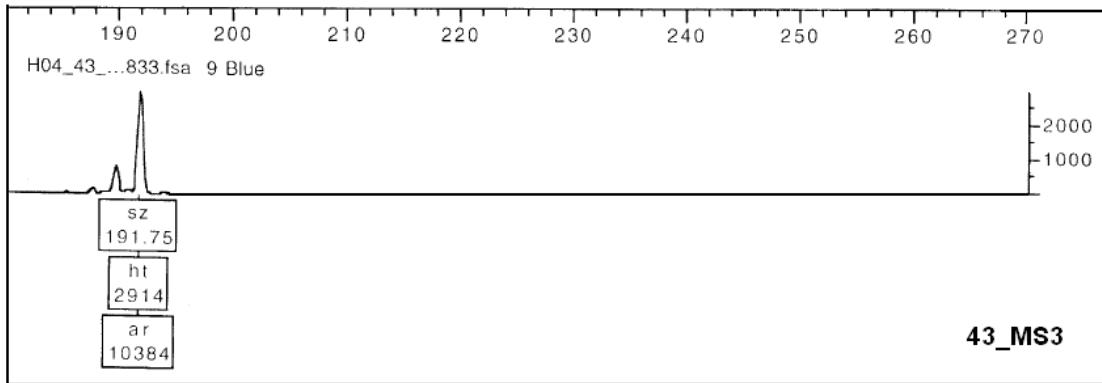


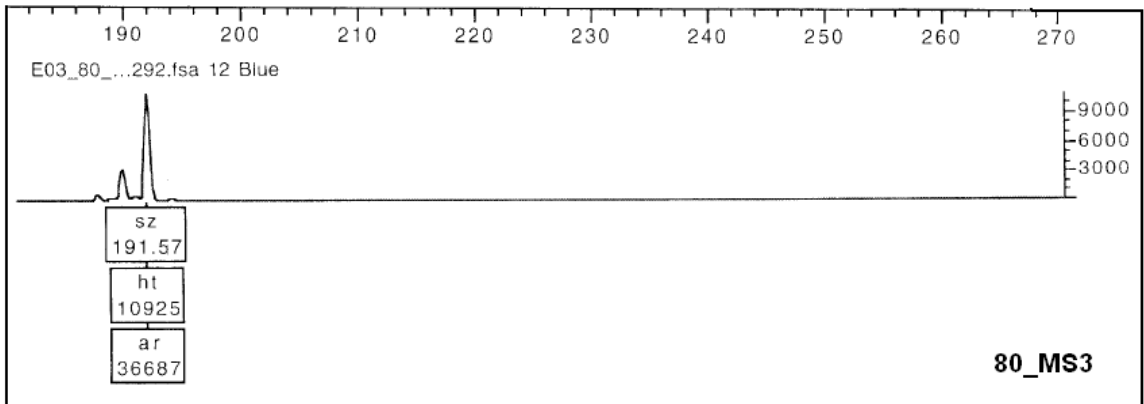
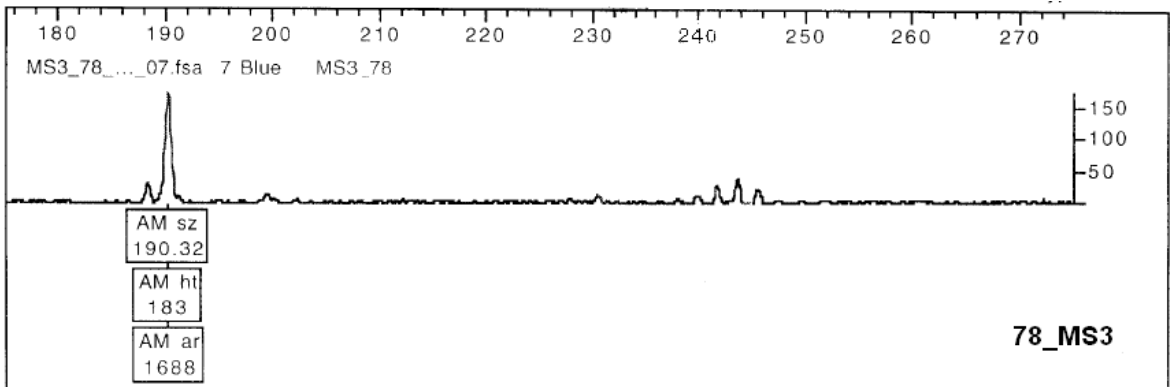
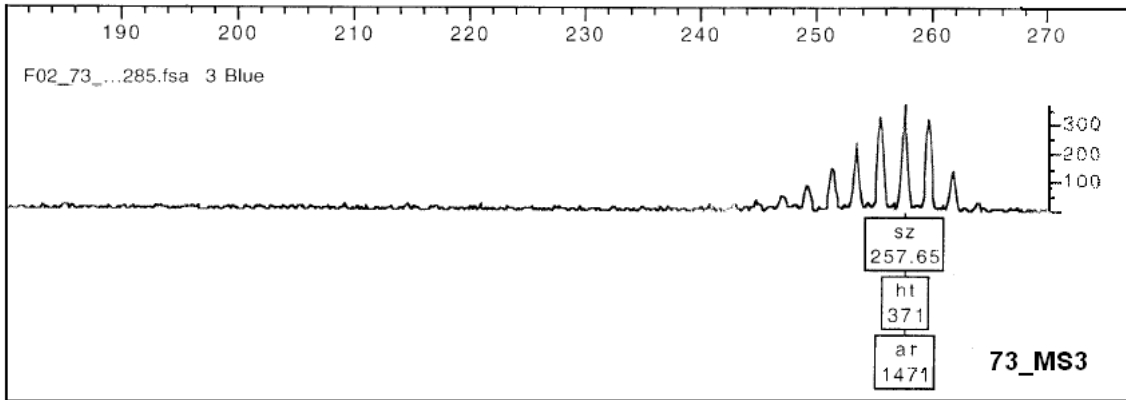
2. Locus MS3

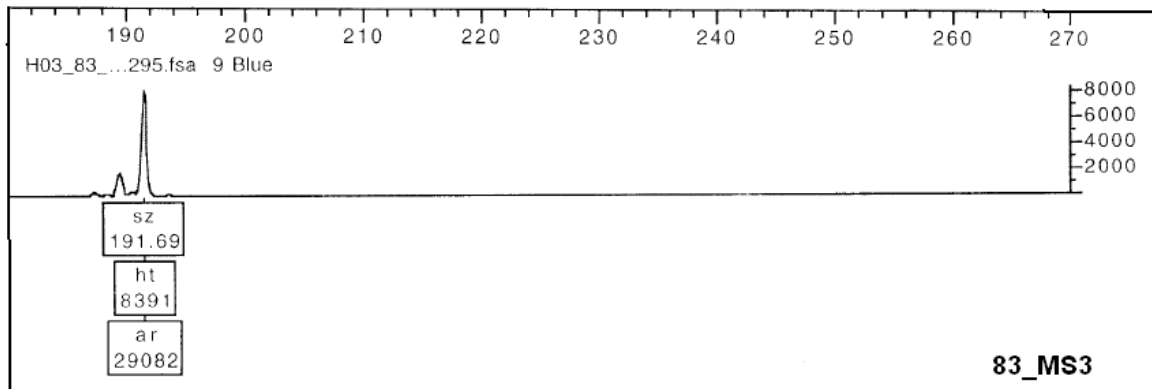
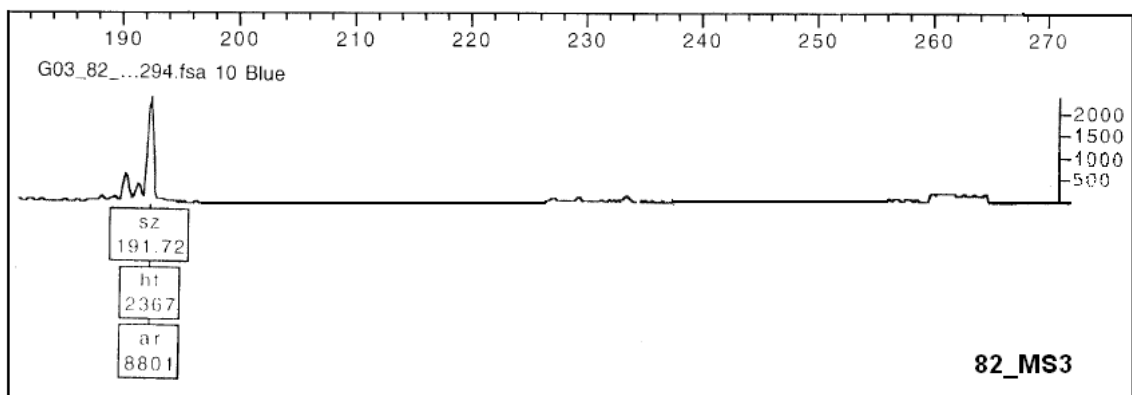
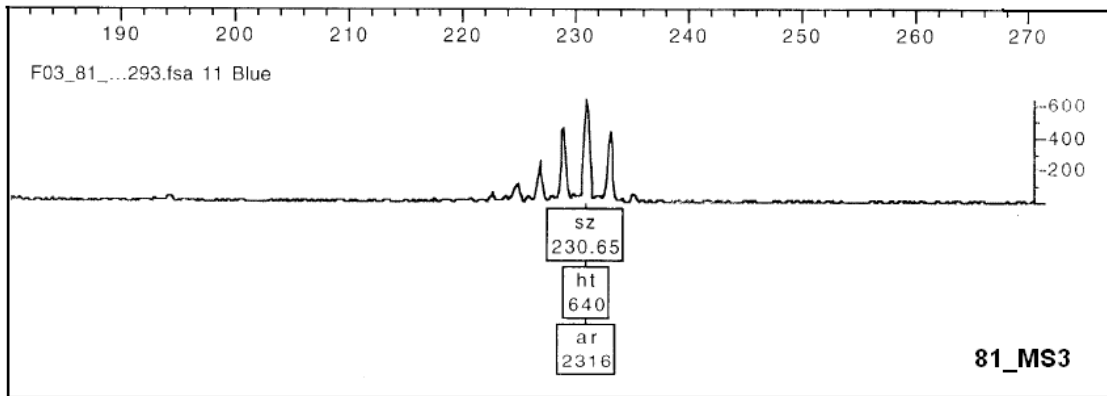


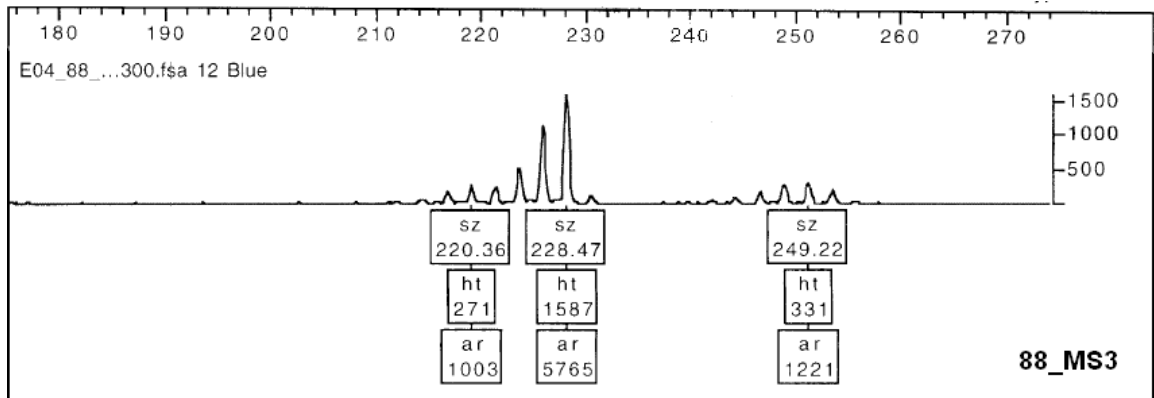
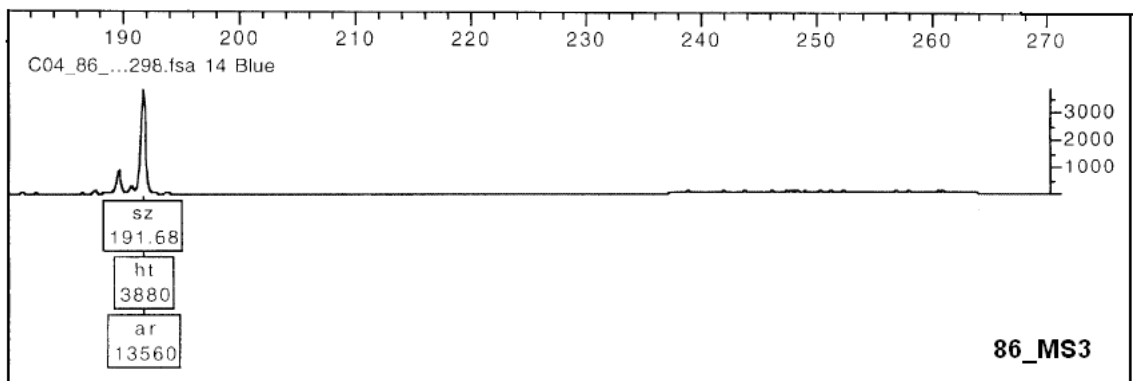
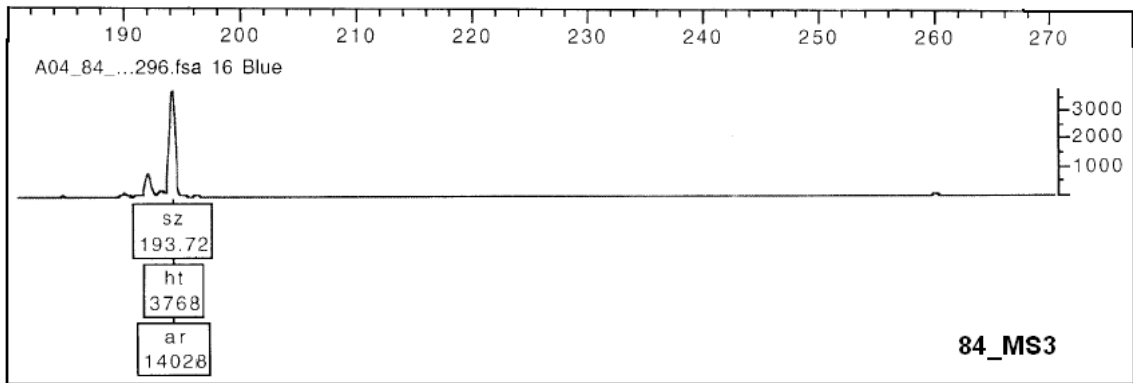


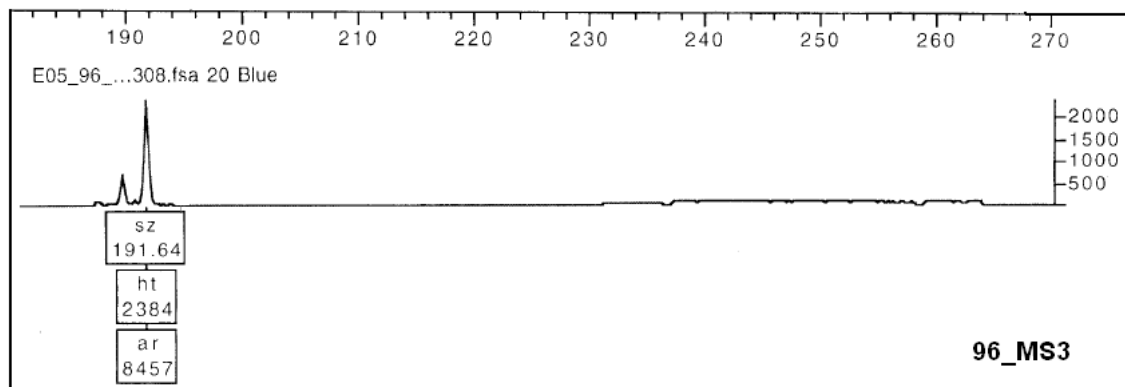
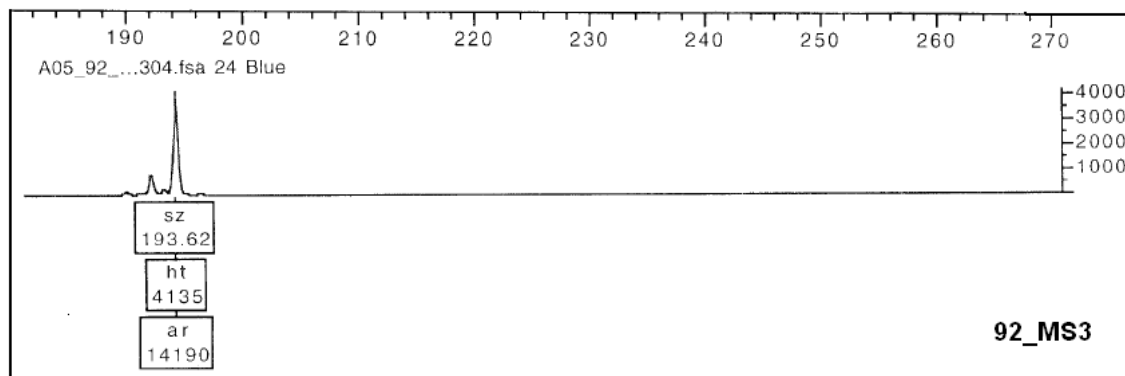
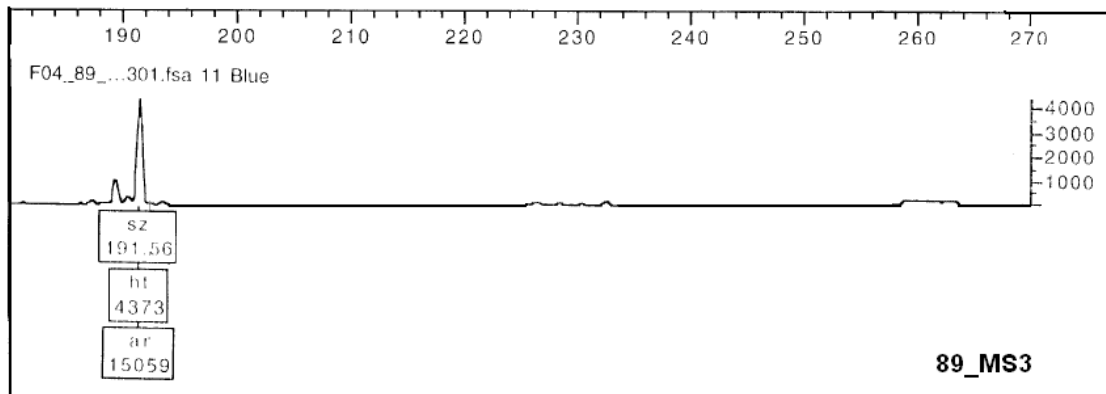


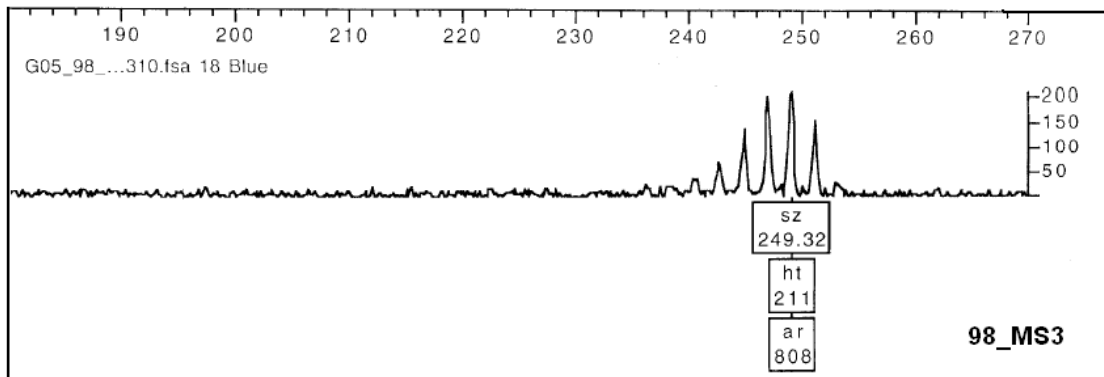
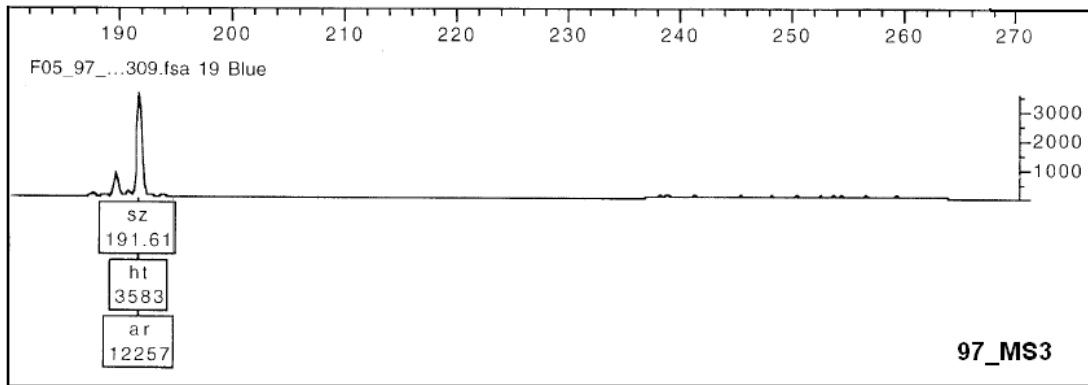












XII. GLOSARIO

- Alelo:** Una de las formas variantes de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias tales como el color del cabello o el tipo de sangre.
- Cebador:** Una secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.
- Cromosoma homólogo:** Cada uno de los miembros de un par de cromosomas que se aparean durante la meiosis; uno de los cromosomas proviene de la madre y el otro del padre. Los cromosomas homólogos contienen la misma secuencia lineal de genes y tienen el mismo tamaño y morfología. Se tiñen asimismo de la misma manera, de modo que en ambos se observan idénticas bandas características.
- Diferenciación génica:** Distribución de los alelos en varias poblaciones. Es decir que compara la probabilidad de que un alelo por si solo pueda encontrarse en otro individuo.
- Diferenciación genotípica:** Distribución de genotipos en varias poblaciones. Es decir comparan la probabilidad de que una pareja de alelos específicos se encuentre en dos individuos.
- Diploide:** El número de cromosomas en la mayoría de las células, excepto en los gametos o células germinales.
- Electroforesis:** Es la técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica. La electricidad empuja las moléculas a través de los poros de un gel, que es una sustancia firme como la gelatina. El gel puede hacerse de manera que sus poros tengan distintas dimensiones para separar las moléculas según un rango específico de tamaños y formas. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que

	las más grandes.
Especificidad	Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo negativo (previamente diagnosticado bajo un estándar de oro), es decir, la probabilidad de que para un sujeto realmente negativo se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los negativos.
Locus:	Posición que un gen ocupa en el cromosoma o en la molécula de ácido nucleico que funciona como material hereditario. Segmento de ADN o ARN que coincide con un gen determinado, sin tomar en consideración su secuencia de bases (es un concepto principalmente topográfico). El plural de «locus» es loci en inglés y en latín.
Marcador Genético:	Un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce.
Microsatélite:	Son pequeñas regiones de ADN que contienen múltiples copias de secuencias repetitivas cortas y que se emplean como marcadores genéticos para rastrear la herencia familiar o mapear enfermedades en el genoma.
Nucleótido:	Uno de los componentes estructurales o unidades constituyentes del ADN o del ARN. Un nucleótido consta de una base (adenina, timina, guanina, uracilo o citosina), más una molécula de azúcar y una de ácido fosfórico.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una técnica rápida y económica para hacer un número ilimitado de copias de cualquier fragmento del ADN. La PCR, o fotocopiado

molecular como se le dice algunas veces, ha tenido un inmenso impacto en biología y medicina, y especialmente en la investigación genética.

- PCR anidado:** Técnica que comporta dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda (interna) PCR flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (externa). El método de la PCR interna se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas.
- Polimórfico:** Es la existencia de dos o más alelos de un gen presentes en una población, en una frecuencia significativa.
- Sensibilidad** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo positivo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto (diagnosticado previamente bajo un estándar de oro) se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar.
- Valor Predictivo Negativo** Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba sea realmente negativo (según estándar de oro). Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos (según estándar de oro) entre el total de sujetos con un resultado negativo en la prueba.
- Valor Predictivo Positivo** Es la probabilidad de que un sujeto sea realmente positivo (según estándar de oro) si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de sujetos con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar positivos bajo el estándar de oro.

