

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS LINAJES DE *Trypanosoma cruzi*
ENCONTRADOS EN HECES DE LOS VECTORES *Triatoma dimidiata* y
Rhodnius prolixus UTILIZANDO EL GEN DEL MINI EXÓN.**

Trabajo de investigación presentado
por Claudia Maribel Paiz Reyes
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2008

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS LINAJES DE *Trypanosoma cruzi*
ENCONTRADOS EN HECES DE LOS VECTORES *Triatoma dimidiata* y
Rhodnius prolixus UTILIZANDO EL GEN DEL MINI EXÓN.**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

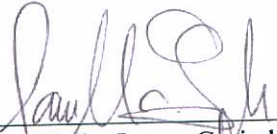


**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS LINAJES DE *Trypanosoma cruzi*
ENCONTRADOS EN HECES DE LOS VECTORES *Triatoma dimidiata* y
Rhodnius prolixus UTILIZANDO EL GEN DEL MINI EXÓN.**

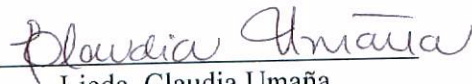
Trabajo de investigación presentado
por Claudia Maribel Paiz Reyes
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología


Guatemala
2008

VoBo.

f) 
Licda. Laura Grájeda
Asesor Principal

Tribunal Examinador

f) 
Licda. Claudia Umaña
Asesora

f) 
Dra. Pamela Pennington
Asesora

Fecha de aprobación: 26 de junio de 2008

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a las personas que me asesoraron durante la ejecución de este proyecto a: Dra. Pamela Pennington, por haberme permitido realizar mi práctica profesional y tesis en el laboratorio de Chagas de la Universidad del Valle y por brindarme su ayuda en el análisis de dato. A. Licda. Laura Grajeda por permitirme realizar mi tesis como parte del proyecto “Estudio del ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* entre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* mediante la tipificación genética de este parásito” FODECYT 085-2006 y por asesorarme en la realización de la misma. Un sincero agradecimiento a todas las personas que brindaron su ayuda y apoyo incondicional durante la ejecución de esta tesis, Claudia Umaña, Renata Cabrera y Bernarda Molina.

Finalmente, un expreso agradecimiento a mis padres, hermanos y a mi novio por todo su cariño y apoyo brindado a lo largo de mis estudios universitarios.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| LISTA DE CUADROS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| RESUMEN | xiii |
| Capítulos | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 2 |
| A. Enfermedad de Chagas | 2 |
| B. Transmisión | 3 |
| 1. Forma primaria de transmisión | 3 |
| 2. Formas secundarias de transmisión. | 4 |
| a. Transmisión transfusional. | 4 |
| b. Transmisión congénita. | 4 |
| C. Vectores | 4 |
| 1. Distribución | 5 |
| 2. Ecología | 5 |
| 3. Ciclo biológico | 6 |
| a. Huevo | 7 |
| b. Ninfá | 7 |
| c. Adulto | 8 |
| 4. Capacidad vectorial | 8 |
| 5. Índice de dispersión de <i>R. prolixus</i> y <i>T. dimidiata</i> | 8 |
| 6. <i>Rhodnius prolixus</i> | 9 |
| a. Distribución | 9 |
| b. Ecología | 10 |
| c. Infestación | 10 |
| 7. <i>Triatoma dimitiata</i> | 11 |

| | |
|---|----|
| a. Distribución | 11 |
| b. Ecología | 11 |
| c. Infestación | 12 |
| D. Trypanosomas | 13 |
| 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> | 13 |
| a. Morfología | 13 |
| b. Ciclo de vida | 14 |
| 2. <i>Trypanosoma rangeli</i> | 15 |
| a. Morfología | 15 |
| b. Ciclo de vida | 17 |
| c. Reservorios | 17 |
| E. Variabilidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| 1. Caracterización bioquímica | 20 |
| a. Electroforesis enzimática | 20 |
| 2. Caracterización molecular | 20 |
| a. Análisis de esquizodemos | 21 |
| b. Análisis RAPD | 21 |
| c. Análisis de RFLP-ITS-ADNr | 21 |
| d. Microsatélites | 22 |
| e. Gen del mini-exón | 23 |
| 1). Detección utilizando el gen del mini exón | 25 |
| F. Análisis Evolutivo | 27 |
| 1. Hipótesis evolutiva de Gaunt & Miles, 2000 | 27 |
| 2. Hipótesis evolutiva según Kawashita, et. al 2001 | 31 |
| G. Quimioterapia | 33 |
| 1. Nifurtimox y benznidazol | 34 |
| 2. Azoles | 36 |
| 3. Allopurinol y pirazol pirimidinas | 36 |
| 4. Inhibidores de cisteína proteasas (cruzipaina, cruzaina) | 38 |
| H. Recursos disponibles para ésta tesis | 40 |
| 1. Procedimiento para recolección de triatomíneos | 40 |
| 2. Muestras | 41 |
| 3. Extracción de ADN de heces preservadas en seco y en urea (Kit Isoquick “Nucleic Acid Extraction” (ORCA, USA) | 42 |

| | | |
|-------|--|----|
| III. | JUSTIFICACIÓN | 44 |
| IV. | HIPÓTESIS | 46 |
| V. | OBJETIVOS | 47 |
| | A. Objetivo general | 47 |
| | B. Objetivos específicos | 47 |
| VI. | MATERIALES Y MÉTODOS | 48 |
| | A. Muestras de ADN | 48 |
| | B. Controles | 48 |
| | C. Extracción de ADN de control para <i>T. rangeli</i> | 48 |
| | D. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región intergénica del gen del miniexón (NTS-ME) | 49 |
| | 1. Optimización | 49 |
| | a. Reacción externa | 49 |
| | b. Reacción interna múltiplex | 49 |
| | 2. Análisis de muestras | 49 |
| | E. Análisis estadístico | 50 |
| VII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 51 |
| | A. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa(PCR) de la región intergénica del gen del miniexón(NTS-ME) | 51 |
| | 1. Optimización | 51 |
| | 2. Análisis de muestras | 56 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 65 |
| IX. | RECOMEDACIONES | 66 |
| X. | LITERATURA CITADA | 67 |
| XI. | APÉNDICE | 77 |
| | A. Condiciones de PCR optimizadas para análisis de muestras | 77 |
| | 1. Reacción externa | 77 |
| | 2. Reacción interna múltiplex | 77 |
| | 3. Reacción interna para <i>T. cruzi</i> II | 78 |
| | B. Datos de los cebadores utilizados para esta tesis | 78 |
| | C. Alineación de los cebadores utilizados para esta tesis | 78 |
| | D. Preparación de reactivos | 81 |
| | 1. Buffer de lisis 2X, para extracción de ADN | 81 |

| | |
|--|----|
| 2. Buffer de lisis con proteinasa K | 81 |
| 3. Buffer TBE 10X | 81 |
| 4. Solución stock de acrilamida: Bis | 82 |
| 5. Gramos de reactivo necesario según proporción | 82 |
| 6. Preparación de APS al 25% | 82 |
| E. Procedimiento electroforesis en geles de poliacrilamida | 83 |
| 1. Preparación de las placas | 83 |
| 2. Preparación del gel | 83 |
| F. Muestras de heces utilizadas para esta tesis y resultado obtenido | 84 |
| G. Código SAS: Valores predictivos para tablas de contingencia | 91 |
| H. Resultados SAS: Análisis de Valor Predictivo | 96 |

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|--------|
| 1. Diferentes clasificaciones propuestas para <i>T. cruzi</i> | 25 |
| 2. Hábitats de triatomínicos, hospederos y tripanosomas | 29 |
| 3. Hábitats y asociaciones propuestas para las mayores subdivisiones de <i>Trypanosoma cruzi</i> (I y II) | 30 |
| 4. Condiciones de cebadores reacción externa | 52 |
| 5. Protocolo base y final para PCR externo | 52 |
| 6. Protocolo base y final para PCR interno múltiplex | 53 |
| 7. Cebadores y sus respectivos Tm | 54 |
| 8. Resultados obtenidos para muestras de heces de triatomínicos | 57 |
| 9. Resultados obtenidos para cultivos de tracto digestivo de <i>T. dimidiata</i> | 58 |
| 10. Distribución de TCI y TCI y II en <i>T. dimidiata</i> y <i>R. prolixus</i> | 60 |
| 11. Asociación de TCI con TCII y de <i>T. rangeli</i> con <i>T. cruzi</i> en muestras de heces de cada individuo de <i>R. prolixus</i> | 62 |
| 12. Asociación de TCI con TCII y de <i>T. rangeli</i> con <i>T. cruzi</i> en muestras de heces de cada individuo de <i>T. dimidiata</i> | 62 |
| 13. Asociación de TCI con TCII y de <i>T. rangeli</i> con <i>T. cruzi</i> en muestras de heces de cada individuo de <i>R. prolixus</i> y <i>T. dimidiata</i> | 63 |
| 14. Distribución de TCI y TCI y II en heces y cultivos intestinales de <i>T. dimidiata</i> | 63 |
| 15. Datos de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR | 78 |

| | |
|---|----|
| 16. Muestras de heces secas de Jalapa y Zacapa | 84 |
| 17. Muestras de heces urea de Chiquimula | 86 |
| 18. Muestras de cultivos de tracto digestivo de <i>T. dimidiata</i> | 88 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1. | Dispersión de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma dimidiata</i> | 9 |
| 2. | <i>Rhodnius prolixus</i> | 10 |
| 3. | Infestación de <i>Rhodnius prolixus</i> en casas de áreas endémicas | 11 |
| 4. | <i>Triatoma dimidiata</i> | 12 |
| 5. | Infestación de <i>Triatoma dimidiata</i> en casas de áreas endémicas | 13 |
| 6. | Estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i> | 14 |
| 7. | Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 16 |
| 8. | Morfología de <i>Trypanosoma rangeli</i> . | 17 |
| 9. | <i>Trypanosoma rangeli</i> | 19 |
| 10. | Esquema de la amplificación del gen del mini exón | 26 |
| 11. | Esquema de PCR múltiplex para detección de linajes de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | 27 |
| 12. | Filogenia de cepas de <i>T. cruzi</i> basado en análisis genético de secuencias ADNr 18S y la región D7 de secuencias ADNr 24S α | 32 |
| 13. | Hipótesis de la evolución de Riboclados de <i>T. cruzi</i> y mamíferos | 33 |
| 14. | Estructuras del benznidazol y nifurtimox | 35 |
| 15. | Estructuras del miconazol y ketoconazol | 37 |
| 16. | Optimización PCR del NTS-ME visualizado en un gel de | |

| | | |
|-----|---|----|
| | poliacrilamida al 10% teñido con plata. | 54 |
| 17. | Amplificación con PCR múltiplex del NTS-ME de muestras de heces secas | 55 |
| 18. | Amplificación con PCR para <i>T. cruzi</i> II del NTS-ME de muestras de heces secas | 56 |
| 19. | Resultados obtenidos(%) para muestras de heces de triatominos | 57 |
| 20. | Resultados obtenidos para cultivos de tracto digestivo de <i>T. dimidiata</i> | 58 |
| 21. | Alineación para producto externo utilizando los cebadores kMe1F y kMe2R | 78 |
| 22. | Alineación para producto interno <i>T. cruzi</i> Z3 | 79 |
| 23. | Alineación para producto interno <i>T. cruzi</i> I | 79 |
| 24. | Alineación para híbrido (<i>T. cruzi</i> I y II) cepa CL Brener | 79 |

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el agente *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por vectores triatomínicos de la familia Reduviidae. En Guatemala los principales vectores son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, siendo el hábitat de *R. prolixus* estrictamente domiciliar y *T. dimidiata* doméstico, peridoméstico y selvático. En Sur América, *T. cruzi* I (TCI) y *T. cruzi* II (TCII) se han asociado a diferentes ciclos de transmisión, siendo TCII el principal grupo asociado a la transmisión doméstica mientras que el TCI se ha asociado tanto a transmisión selvática como doméstica. (Fernandes, *et. al.* 1998,1998a, 1999, 2001, Miles, *et. al.* 1977). En México y Centro América se ha reportado que el TCI es el principal grupo asociado tanto a la transmisión doméstica como la selvática (Ruíz-Sánchez, *et. al.* 2005).

En el presente estudio se caracterizó la tasa de infección con TCI y TCII en *T. dimidiata* y *R. prolixus* colectados en ambientes domésticos en Guatemala. Para ello se utilizó una técnica molecular mediante el análisis del gen del mini-exón. En muestras de heces de *T. dimidiata* se determinó que se encuentra infectada en 33%(8/24) con TC I, 13%(3/24) con mezcla de TCI y II. *R. prolixus* está infectado en 8%(7/89) con TCI, 2%(2/89) con mezcla de TCI y II y un 39%(35/89) con *T. rangeli*. Se determinó que no existe diferencia significativa ($p = 0.6299$) entre los linajes de *T. cruzi* encontrados en *R. prolixus* y *T. dimidiata*, lo cual puede indicar claramente un traslape entre los ciclos de transmisión domésticos y selváticos. En cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata* se encontró 16%(7/44) de TCI y 84%(37/44) de mezcla TCI y II. Se determinó que existe diferencia significativa ($p=0.0005$) entre los linajes de *T. cruzi* encontrados en heces y cultivos de *T. dimidiata*. Se recomienda aumentar el número de muestras de *T. dimidiata* para aumentar la significancia estadística.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el agente *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por vectores triatominos de la familia Reduviidae. En Guatemala los principales vectores son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, siendo el hábitat de *R. prolixus* estrictamente domiciliar y *T. dimidiata* doméstico, peridoméstico y selvático.

Análisis bioquímicos y moleculares de *T. cruzi* han demostrado que dicho parásito presenta variabilidad genética, dividiéndose en subgrupos o linajes: *T. cruzi* I(TCI), *T. cruzi* II(TCII) y *T. cruzi* Z3(Z3). En Sur América, TCI y TCII han sido asociados a diferentes ciclos de transmisión: TCII asociado principalmente a la transmisión doméstica, mientras que TCI se ha asociado a la transmisión selvática como a la doméstica (Fernandes, *et. al.* 1998,1998a, 1999, 2001, Miles, *et. al.* 1977). En México y Centro América, TCI se ha asociado tanto a la transmisión doméstica como a la selvática. (Ruíz-Sánchez, *et. al.* 2005)

Estudios evolutivos sugieren una asociación entre el género *Triatoma* con el TCII y Z3, y *Rhodnius* con el TCI (Gaunt & Miles, 2000). También se ha sugerido que el TCI evolucionó asociado a marsupiales en América del Sur y que el TCII evolucionó asociado a placentales en América del Norte (Kawashita, *et. al.* 2001).

Estudios en ratones y en humanos demuestran que el TCI presenta mayor resistencia a fármacos que el TCII y que infecciones mezcladas de ambos grupos generan diferentes perfiles de resistencia (Martins, *et.al.*, 2007, Toledo, 2003, Coronado, 2006). Por ello, se ha sugerido que se debe tomar en cuenta la diversidad genética de los parásitos en la mejora de la quimioterapia a nivel regional, enfocada a los linajes que se encuentren en Guatemala.

Utilizando la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), este estudio tiene como objetivo caracterizar la tasa de infección con TCI y TCII en *T. dimidiata* y *R. prolixus* colectados en ambientes domésticos en Guatemala.

II. ANTECEDENTES

A. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (T. 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 (Rodríguez, *et. al.* 2004).

Estudios serológicos indican que la prevalencia global de la enfermedad de Chagas ha sido reducida de los estimados de 1990 de 16-18 millones de personas infectadas a 9.8 millones, y puede esperarse una posterior declinación debido a cambios demográficos y como resultado de intervenciones de control. De los 100 millones de personas en riesgo de la enfermedad de Chagas en 1990, ~60 millones de personas no comparten más sus hogares con los triatomos, ~40 millones de personas se encuentran en riesgo. (Schofield, Jannin y Salvatella, 2006). Se estima que ocurren 200,000 nuevos casos por año en áreas donde la enfermedad es endémica. (WHO, 2005). En Guatemala, el número estimado de personas infectadas es 730,000 con una incidencia anual estimada de 30,000, representando aproximadamente un 7.3% y 0.3% de la población nacional respectivamente (WHO, 2000).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases: la fase aguda y la fase crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas o ser potencialmente mortales (CDC, 2007). La fase aguda tiene lugar las primeras semanas o meses de la infección. Generalmente pasa desapercibida porque no muestra síntomas o exhibe sólo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas. Los síntomas que nota el paciente pueden incluir fiebre, fatiga, dolor en cuerpo, dolor de cabeza, sarpullido, pérdida de apetito, diarrea y vómito. Los signos detectados en el examen físico pueden incluir agrandamiento leve del hígado o el bazo, inflamación de los ganglios e inflamación local (un chagoma), en el lugar donde el parásito ingresó en el cuerpo. El marcador más reconocido de la enfermedad de Chagas aguda se conoce como signo de Romana, que

incluye inflamación del párpado en el lado del rostro cerca de la herida dejada por la picadura, donde fueron depositadas las heces del insecto o se frotaron accidentalmente en el ojo. Aún si los síntomas aparecen durante la fase aguda, por lo general desaparecen por sí solos, en unas cuantas semanas o meses. Aunque los síntomas desaparecen, la infección persiste si no se le trata. En muy pocas ocasiones, los niños pequeños (<5%) mueren por inflamación/infección grave del músculo cardíaco (*miocarditis*) o del cerebro (*meningoencefalitis*). La fase aguda también puede ser grave en las personas con sistemas inmunitarios debilitados (CDC, 2007).

Durante la fase crónica, la infección puede que permanezca asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan:

- Complicaciones cardíacas, las cuales pueden incluir agrandamiento del corazón (miocardiopatía), insuficiencia cardíaca, alteración del ritmo o frecuencia cardíaca y paro cardíaco (muerte súbita); y/o
- Complicaciones intestinales, que pueden incluir un agrandamiento del esófago (megaesófago) o del colon (megacolon) y pueden causar dificultades para comer o defecar (CDC, 2007).

El riesgo promedio de presentar una o más de estas complicaciones durante el transcurso de la vida es de aproximadamente un 30% (CDC, 2007).

Se estima que un 25-30% de las personas progresan a una patología cardíaca irreversible, causando una considerable morbilidad y mortalidad (WHO, 2002).

B. Transmisión

1. **Forma primaria de transmisión.** La transmisión ocurre principalmente por el contacto de la piel o las mucosas de los seres humanos o de otros mamíferos, con heces de insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae (*Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrogylus*) infectados con *T. cruzi*, debido a que estos insectos defecan sobre la persona en el momento en que pican e ingieren sangre. Esta forma de transmisión representa del 80-90 % de transmisión (Rodríguez, *et. al.* 2004).

2. Formas secundarias de transmisión. Además de la vía vectorial existen la transmisión transfusional (5-20 %) y la vía congénita (0.5-8 %). Las otras vías de transmisión son excepcionales (accidental, trasplante de órganos, otros vectores, lactogénica, etc.) y no representan una importancia significativa en términos de salud pública (Rodríguez, *et. al.* 2004).

a. Transmisión transfusional. La emigración de las zonas rurales a urbanas si bien reduce el número de personas expuestas al vector infectado, aumenta la probabilidad de transmisión por transfusión. En cuanto no se descarte la sangre de donadores contaminados, existirá la probabilidad de transmitir la enfermedad por esta vía, siendo los más expuestos los individuos poli-transfundidos, tales como hemofílicos y los que reciben diálisis. Afortunadamente, sólo una parte (12 a 18-25%) de los que reciben transfusión con sangre infectada, contraen la enfermedad. Por otro lado, la infección transfusional, se ha convertido en un serio problema en los países desarrollados (donde no hay transmisión vectorial) debido a las decenas de millones de latinoamericanos que emigra a estos países (Rodríguez, *et. al.* , 2004).

b. Transmisión congénita. Constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas. Este tipo de transmisión parece depender de factores ligados al parásito y al hospedador. Ocurre cuando el *T. cruzi*, al igual que atraviesa las mucosas, penetra el epitelio trofoblástico (Rodríguez, *et. al.* 2004).

C. Vectores

Los vectores de la enfermedad de Chagas son insectos hematófagos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*. Actualmente se conocen más de 130 especies de triatominos; sin embargo solo tres géneros, i.e., *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son vectores importantes de la enfermedad de Chagas (Monroy, 2003b). Los cinco vectores más importantes en América Latina son: *T. infestans*, *T. dimidiata* (Latreille, 1811) *T. brasiliensis*, *R. prolixus* (Stal, 1859) y *P. megistus*.

1. Distribución. Los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* están ampliamente distribuidos en las Américas, en hábitats domésticos desde México hasta Argentina y Chile. Los triatominos salvajes tienen una distribución aún más amplia, desde USA hasta la Patagonia (Monroy, 2003b).

En Guatemala se han encontrado 3 especies de triatominos, estableciéndose su presencia en 21 de los 22 departamentos del país. Existen dos especies principales: *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Marroquín y Mizuno, 2003; Dorn, *et. al.* 2003). *Triatoma nítida* (Usinger, 1939), se ha encontrado en los departamentos: Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Jutiapa, Quiché y Santa Rosa. *T. nítida* no tiene importancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas en Guatemala (Monroy, *et. al.* 2003).

2. Ecología. En el caso de los humanos, la transmisión del parásito se da a través de las deyecciones de las chinches (OMS, 1991). La infección por *Trypanosoma cruzi* existe en muchas áreas como un ciclo entre el triatomino silvestre y los mamíferos pequeños como roedores y marsupiales. Todos los triatominos son originarios del ambiente natural, tornándose epidemiológicamente importantes en la medida en que estrechan su relación con el hombre (Diotauti, 2006). En muchos lugares no hay ningún contacto humano con la chinche silvestre; la infección humana sólo ocurre a través del contacto accidental con ésta, o por iniciación de un ciclo doméstico de transmisión cuando invaden y colonizan casas (Schofield, 1994; Schofield, 2000).

Las especies de mayor significación epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos, viviendo en las grietas y hendiduras de las casas rurales, en las uniones entre los adobes y ladrillos, los espacios entre tablas de madera, también los techos de hojas de palmeras. Éstas permanecen inmóviles durante el día y emergen de noche para alimentarse de los ocupantes humanos. Sin embargo, muchas de las especies principalmente selváticas invaden ocasionalmente las casas (por ejemplo atraídas por la luz) y pueden contribuir a la transmisión de *T. cruzi* a los humanos (Schofield, 1994; Lent & Wygodzinsky, 1979). Otros factores que favorecen la infestación son el uso de telas como cortinas, el almacenamiento de los productos de las cosechas, el depósito de adobes y el apilamiento de maderas y

palos dentro de la casa, y, por último, la presencia de animales domésticos en el interior de las casas, como: cuyes, conejos, gallinas, pavos, perros, gatos, etc. (Cáceres, 2005).

Los triatominos ocupan distintos ecótopos tales como madrigueras de mamíferos, nidos de aves, cuevas de murciélagos, troncos, bromelias, pilas de rocas y palmeras. Muchos se han vuelto peridomésticos y varias especies se han domesticado lo cual significa que se han adaptado a la vivienda humana. (Lent & Wygodzinsky, 1979; Guhl, 2000; Schofield, 2000).

Las especies de triatominos con poblaciones silvestres y domiciliadas, representan un potencial riesgo para los programas de control de la enfermedad de Chagas porque pueden infestar fácilmente las áreas tratadas a partir de sus poblaciones silvestres (Borgues, *et. al.* 1999; Angulo, 2006; Agudelo, 2006).

Al momento o después de alimentarse, el triatominos hace una deyección líquida que tiene dos aspectos: uno de color amarillento que se seca rápidamente al contacto del aire, y otro que se seca lentamente y es de color negro. Este comportamiento de picar y defecar se debería a la necesidad del triatominos de succionar más sangre y almacenarla desocupando su intestino (Cáceres, 2005).

Los triatominos son insectos hematófagos con cinco estadios de ninfa y con un dimorfismo sexual en el estadio de adulto. Son insectos que viven bastante tiempo, usualmente con una generación en un año. Algunas características biológicas de los triatominos domésticos los hacen vulnerables al control. Tiene una baja capacidad innata de incrementarse, con un consecuente bajo rango de arreglo genético y disminución de la variabilidad de población; se ha visto que son pobremente adaptados a responder a inestabilidades ambientales como intervención química o por insecticidas (Schofield, 2001).

3. Ciclo biológico. Los triatominos son insectos hemimetábolos. De huevo pasan por cinco estadios ninfales, en los que son muy parecidos a los adultos pero de menor tamaño y carecen de alas. La obtención de sangre para los triatominos es muy necesaria para la muda y continuación de su desarrollo. El ciclo de vida de los triatominos oscila entre 4 y 16 meses o más. Muchas especies de triatominos

han sido adaptadas a condiciones de laboratorio con temperaturas que fluctúan entre 24 °C y 27 °C, y a una humedad relativa entre 70% y 75%, con la finalidad de conocer el ciclo biológico de cada triatomino. Respecto de estos estudios se da a conocer lo siguiente:(Cáceres, 2005).

a. Huevo. Los huevos son colocados entre 10 y 15 días después de la cópula.

Algunas hembras no apareadas pueden poner algunos huevos, pero éstos serán infértiles. Las hembras fértiles generalmente ponen huevos una sola vez, pero en muchos casos continúan poniendo huevos durante toda su vida. El número de huevos puestos por hembra y la frecuencia de la ovipostura depende principalmente de la cantidad de sangre ingerida. En la mayoría de los casos, cada hembra pondrá entre 100 y 600 huevos durante su vida. (Cáceres, 2005).

Los triatominos son de hábitos terrestres, generalmente colocan sus huevos individualmente o en grupo, en cualquier lugar que encuentre la hembra. Pero las especies que habitan en los árboles –como es el caso de la mayoría de especies de *Rhodnius*– colocan sus huevos en grupos pequeños adheridos al sustrato. Los huevos son de forma oval, más o menos elípticos, presentan un opérculo en uno de sus extremos, por el cual emerge la ninfa I. Al inicio, los huevos son de color blanco-perla o gris, posteriormente cambian a rosado o rojizo a medida que el embrión desarrolla, observándose por transparencia los ojos de la futura ninfa. El tiempo que transcurre desde la puesta de los huevos hasta que eclosiona la primera ninfa varía para cada especie; también varía para una misma especie cuando habitan en regiones diferentes. En algunas especies el tiempo es de entre 10 y 30 días. El corión presenta ornamentaciones que varían según las especies (Cáceres, 2005).

b. Ninfa. Presenta cinco estadios ninfales. Transcurridos de dos a tres días

después de emerger, las ninfas ya están listas para alimentarse; de no conseguir alimento pueden pasar varias semanas en ayunas. Todas las etapas de ninfas normalmente se alimentan de la misma variedad de huéspedes que los adultos presentes en el mismo hábitat. Bajo buenas condiciones, las ninfas pueden ingerir sangre hasta nueve veces su

peso, mientras que los adultos, aproximadamente, de 2 a 4 veces. Generalmente, las ninfas que están en el quinto estadio son las que absorben la mayor cantidad de sangre, esto va algunas veces de 400 a 1000 por especie asociada al ser humano. Todos los estadios de ninfa, así como ambos sexos, pueden sobrevivir durante períodos largos sin ingerir alimento, llegando en algunos casos hasta 11 meses (Cáceres, 2005).

c. Adulto. Los triatominos adultos se diferencian de la ninfa por sus alas anteriores y posteriores bien desarrolladas y por ser sexualmente maduros, con los genitales completamente desarrollados (Cáceres, 2005).

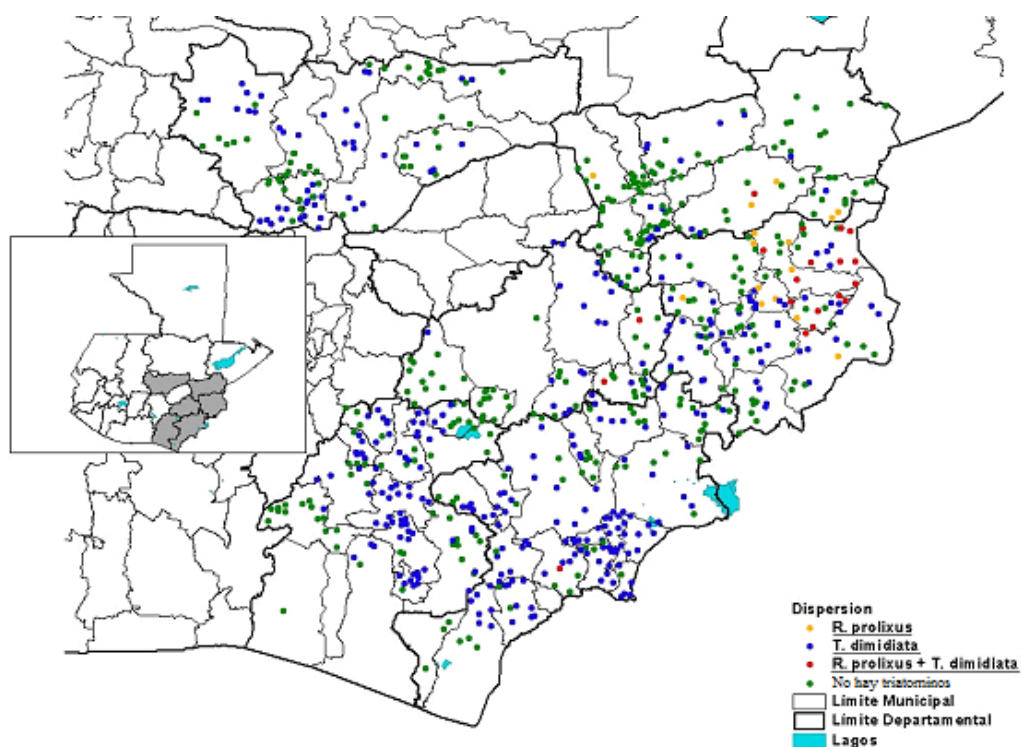
La hembra copula sólo una vez y después de ser fecundada comienza la postura, antes de los 30 días. En algunas especies pueden observarse hasta 40 posturas que sobrepasan los 200 huevos. Los adultos tienen un par de ocelos sensibles a la luz en la parte posterior de la cabeza, justo detrás de los ojos. Las ninfas no tienen estos ocelos. (Cáceres, 2005).

4. Capacidad vectorial. Los vectores más eficientes son aquellos que defecan mientras se alimentan (Schofield y Dolling, 1993). El patrón de defecación de especies de triatominos es una determinante importante de la capacidad vectorial. Una comparación de tres especies demostró que *R. prolixus* tiene una marcada tendencia a defecar más pronto y más frecuentemente luego de la ingestión de sangre que *T. infestans*. Estas dos especies son más eficientes en estos parámetros que *T. dimidiata* (Zeledón y Rabinovich, 1981).

5. Índice de Dispersión de *R. prolixus* y *T. dimidiata*. Nos permite conocer el grado de concentración y la distribución del vector dentro de una determinada área o lugar. Datos de la encuesta entomológica basal realizada en Guatemala durante abril del año 2000 hasta agosto del año 2002, con un tamaño de muestras de 9,944 casas en 737 aldeas, en cinco departamentos Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa, Chiquimula, Baja Verapaz y Zacapa (aprox. 20% de casas de área endémica) se encontró que *Rhodnius prolixus* tienen una dispersión de 4.2%, mientras que *Triatoma dimidiata*

tiene una dispersión de 48.7%(Figura 1) (Cordón-Rosales, 2004).

Figura 1: Dispersión de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*



(Tomado de Cordón-Rosales, 2004)

6. *Rhodnius prolixus*

a. Distribución. *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Figura 2) es un triatomino estrictamente hematófago del orden *Hemiptera* (Azambuja y García, 2005), familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Es considerado el principal vector doméstico de la enfermedad de Chagas en Guatemala (Monroy, *et. al.* 2003), Venezuela, Colombia, El Salvador, Honduras y Nicaragua y es una de las siete especies de triatominos de mayor importancia epidemiológica. También se le conoce en los estados de Chiapas y Oaxaca de la República de México (Ponce y Ponce, sin año).

Se ha reportado en 9 departamentos de Guatemala (Chiquimula, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, El Progreso, Santa Rosa, Baja Verapaz, Quiché y Huehuetenango),

siendo más abundante y con mayor número de infectados con *T. cruzi* en Chiquimula y Zacapa (Monroy, *et. al.* 2003a, Monroy, 2003b, Cerdón-Rosales, 2004).

R. prolixus es un vector más eficiente en la transmisión de *T. cruzi* que *T. dimidiata* (Monroy, *et. al.* 2003). Aproximadamente un 57.6 % de *R. prolixus* capturados en Guatemala están infectados con *T. cruzi* (Dorn, *et. al.* 1999).

b. Ecología. En Centroamérica las poblaciones de *R. prolixus* son genéticamente muy restringidas inhábiles de colonizar diferentes hábitats, muy susceptibles a los insecticidas de acción residual y a los cambios socioeconómicos de las poblaciones rurales (OPS/OMS/MSPAS, 2003.) Las viviendas precarias preferentemente con techos de material vegetal son su hábitat preferido (Ponce y Ponce, sin año).

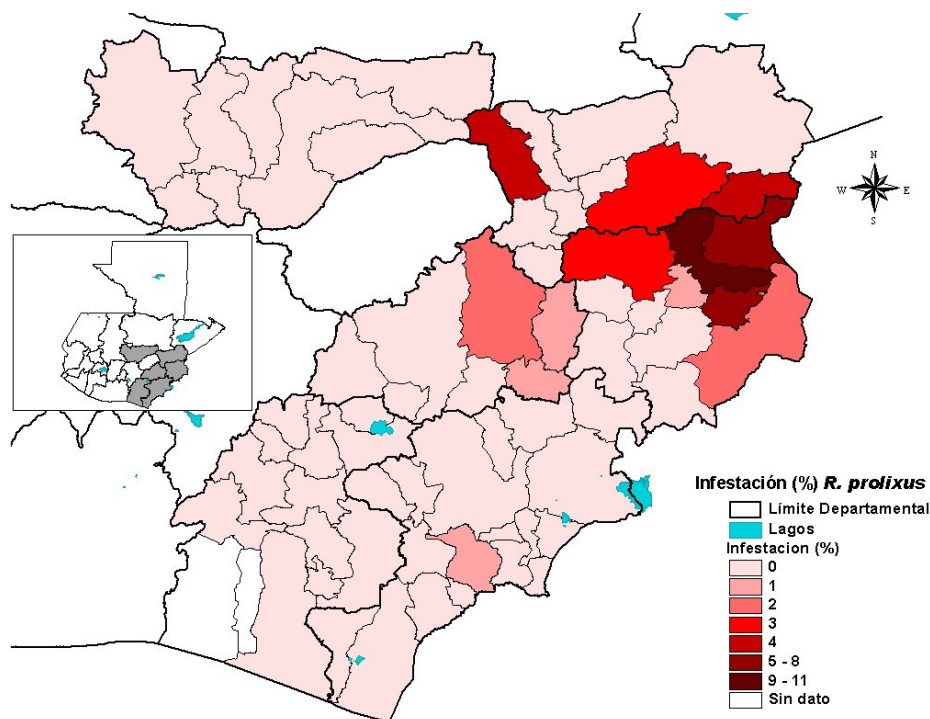
R. prolixus es afectado por *Trypanosoma rangeli* no patogénico para el humano (Azambuja y García, 2005), cuando éste migra del intestino medio hacia la hemolinfa y las glándulas salivares (Monroy y Koga 1997).

Figura 2. *Rhodnius prolixus*



c. Infestación. Según datos de la encuesta entomológica de Guatemala (abril 2000-agosto 2003) la infestación general de casas con *R. prolixus* es de 0.8% en los departamentos Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa, Chiquimula, Baja Verapaz y Zacapa. Tres de 12(25%) de los municipios tenían una infestación de 5-11% con una infección con Tripanosoma de 19.6% (115/588) (Figura 3) (Cerdón-Rosales, 2004).

Figura 3: Infestación de *Rhodnius prolixus* en casas de áreas endémicas.



(Tomado de Cordón-Rosales, 2004)

7. *Triatoma dimidiata*

a. Distribución. *Triatoma dimidiata* (Figura 4) es encontrado desde Sur América (Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú) hasta América Central y México. Es el vector más ampliamente distribuido (21/22 departamentos, con excepción de Totonicapán) siendo más abundante y con mayor número de infectados con *T. cruzi* en Santa Rosa, Chiquimula y Jutiapa (Monroy, *et. al.* 2003).

b. Ecología. Esta especie es capaz de colonizar viviendas humanas, especialmente aquellas de adobe o bajareque, en las cuales se esconden en las grietas de las paredes. Se cree que el transporte pasivo de leña del campo a las viviendas representa un medio importante para la entrada de *T. dimidiata* al ambiente humano; otro medio es la atracción por la luz artificial, ya que esta especie tiene gran capacidad de vuelo (Monroy, 1992, Schofield 1994). Es decir, que esta especie autóctona de la región,

ocupa en general ecótopos naturales y artificiales que pueden estar próximos a las casas, asociados a reservorios silvestres y peridomiciliares, presentando diferentes grados de antropofilia (Panzera, *et. al.* 2006).

De acuerdo con la clasificación de Guhl (2000), *Triatoma dimidiata* se encuentra dentro de las especies adaptadas de manera relativamente estable a la vivienda, pero que también conservan importantes ecótopos silvestres (Schofield, 2000).

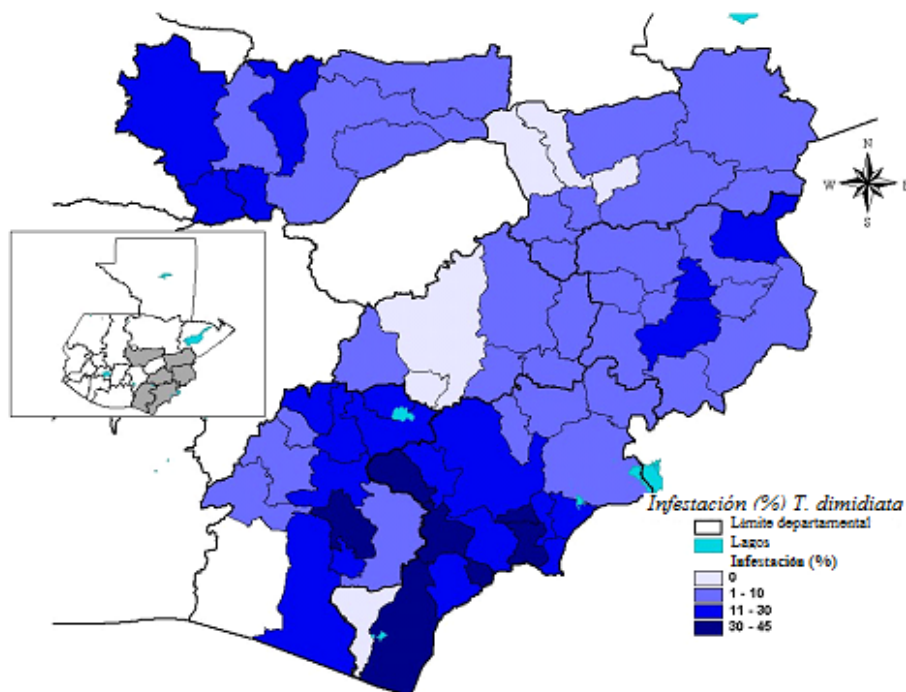
La amplia distribución de *T. dimidiata* y su presencia en ambientes domésticos, peridomésticos y selváticos hacen que sea difícil su erradicación ya que los insectos recolonizan las casas luego de la aplicación de pesticidas piretroides (Dorn, *et. al.* 2003). En Guatemala *T. dimidiata* parece estar asociada con niveles más bajos de seroprevalencia comparada con *R. prolixus* (Dorn, *et. al.* 1999).

Figura 4: *Triatoma dimidiata*



c. Infestación. Según datos de la encuesta entomológica (abril 2000-agosto 2003) la infestación general de casas con *T. dimidiata* es de 12.4% en los departamentos Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa, Chiquimula, Baja Verapaz y Zacapa. Veintinueve de 59(49%) de los municipios tenían una infestación de 12-45% con una infección con Tripanosoma de 20.0% (865/4335) (Figura 5) (Cordón-Rosales, 2004).

Figura 5: Infestación de *Triatoma dimidiata* en casas de áreas endémicas.



(Tomado de Cordón-Rosales, 2004)

D. Tripanosomas

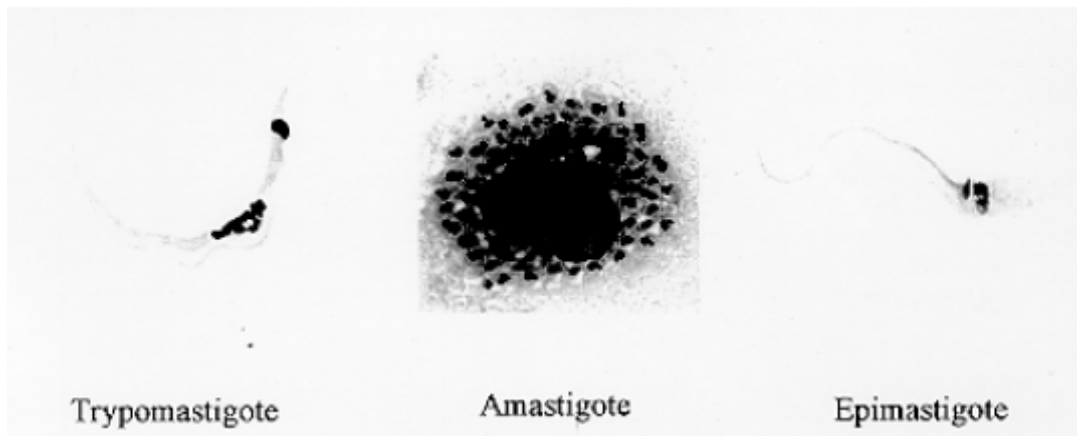
1. *Trypanosoma cruzi*

a. Morfología. El *Trypanosoma cruzi* es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y uno vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral), se definen las siguientes formas evolutivas para los tripanosomatídeos: (Rodríguez, *et. al.* 2004).

- **Epimastigote:** (20 - 40 x 2 μ m) 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 axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Es también la forma de más fácil cultivo “*in vitro*” (Rodríguez, *et. al.* 2004).

- 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 cinetoplasto 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; este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado, carece de capacidad replicativa. (Rodríguez, *et. al.* 2004).

Figura 6. Estadios de desarrollo de *T. cruzi*



(Tomado de de Souza, 1999)

También se puede encontrar una forma llamada esferoamastigote (en el estómago del insecto vector y en determinadas situaciones experimentales *in vitro*). También se pueden observar una serie de formas intermedias (Rodríguez, *et. al.* 2004).

b. Ciclo de vida. Un triatomino infectado ingiere sangre y libera tripomastigotes en las heces cerca del sitio de la picadura. Los tripomastigotes entran al hospedero a través de una herida o a través de membranas mucosas intactas como la conjuntiva ①. Dentro del hospedero los tripomastigotes

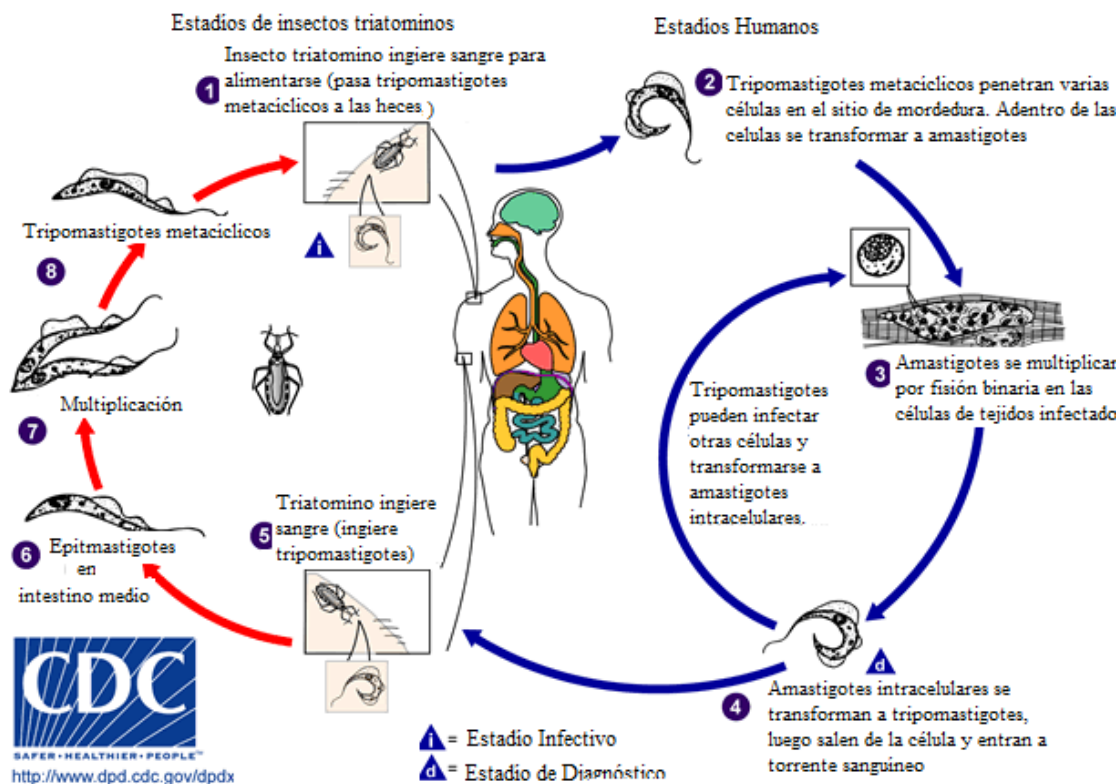
invaden las células cerca del sitio de inoculación, en donde se diferencian a amastigotes intracelulares ②. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria ③ y se diferencian a tripomastigotes, y luego son liberados a la circulación como tripomastigotes sanguíneos ④. Los tripomastigotes infectan las células de una variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. Las manifestaciones clínicas pueden resultar de este ciclo infeccioso. Los tripomastigotes sanguíneos no se replican. La replicación sucede solo cuando los parásitos entran a otra célula o cuando son ingeridos por otro vector. Los triatomíneos se infectan cuando se alimenta de sangre humana o animal que contienen parásitos circulantes ⑤. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector ⑥. Los parásitos se multiplican y diferencian en el intestino medio ⑦ y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino posterior ⑧ (Figura 7) (CDC, 2007).

La distribución geográfica de los triatomíneos y los hospederos vertebrados asociados con la preferencia de fuente de sangre del insecto define dos ciclos de transmisión de *T. cruzi*: un ciclo selvático que envuelve diferentes especies de insectos triatomíneos y animales salvajes; y el ciclo doméstico/peridoméstico en donde los animales domésticos y el humano actúan como reservorios (Macedo, *et. al.* 2004)

2. *Trypanosoma rangeli*. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) es un tripanosoma no patogénico que afecta al hombre y otros vertebrados (Guhl y Vallejo, 2003), sin embargo, ha sido comprobado como patógeno para el insecto vector *Rhodnius prolixus* (Paláu, Montilla y Zúñiga, 2001).

a. Morfología. La forma de *T. rangeli* en la sangre es alargado, de 26-34 μm de largo, incluyendo el flagelo. Tiene un cinetoplasto pequeño, redondo, subterminal; el núcleo está cerca del medio del cuerpo y la membrana ondulante está bien desarrollada. (Guhl y Vallejo, 2003).

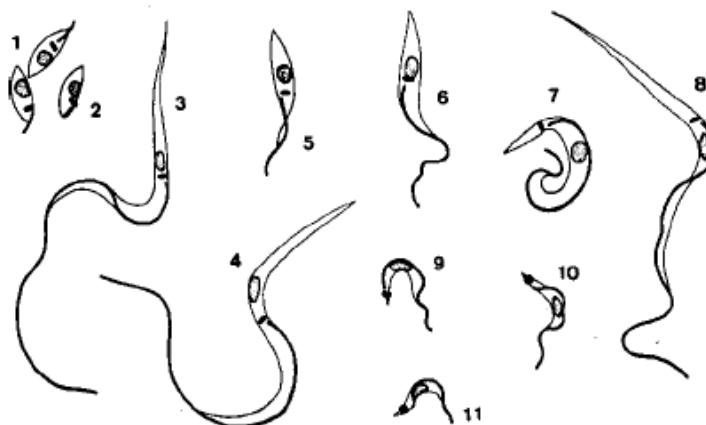
Figura 7: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



(Tomado y modificado del CDC, 2007)

Se pueden distinguir diferentes formas de *T. rangeli* en el hospedero vertebrado y en el invertebrado. Los vectores triatominos se infectan cuando ingieren sangre de animales con *T. rangeli*. En la hemolinfa se encuentran las formas epimastigotes cortos, medianos y largos, y tripomastigotes metacíclicos; también se observan formas en división longitudinal muy activa, formas esferomastigotes y tripomastigotes; además, es frecuente encontrar la presencia de numerosos hemocitos. En las glándulas salivares del insecto se encuentran la mayoría de las formas tripomastigotes metacíclicos infectivas de *T. rangeli*; en el intestino sólo hay formas largas de epimastigotes (Paláu, Montilla y Zúñiga, 2001).

Figura 8: 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)

b. Ciclo de vida. La interacción entre *T. rangeli* y sus hospederos invertebrados inicia luego de la ingestión de formas tripomastigotes durante la ingestión de sangre del triatomino. Seguido de la ingestión, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes los cuales se multiplican en el intestino del insecto vector. Luego de que llegan al lumen intestinal, los epimastigotes invaden el hemocelo, en el cual permanecen para multiplicarse ya sea dentro o fuera del hemocelo y, luego, penetran a través de las glándulas salivares, especialmente en especies de *Rhodnius*, donde ocurre la metaciclogénesis, donde se forman los tripomastigotes metacíclicos. (D'Alessandro & Hincapie 1986). Para completar su ciclo biológico en la naturaleza, *T. rangeli* es transmitido a su hospedero vertebrado a través de la inyección de saliva durante la ingesta de sangre. (Vallejo, *et. al.* 1988).

c. Reservorios. *T. rangeli* presenta una distribución geográfica que se superpone con la de *T. cruzi*, compartiendo en muchos casos el mismo insecto vector y también reservorios comunes de *T. cruzi* (Mejía, Paláu y Zuñiga, 2004). *T. rangeli* presenta una amplia gama de reservorios vertebrados distribuidos entre cinco ordenes: Edentala, Marsupialia, Carnivora, Rodentia y Primates. Diferentes especies

incluyendo ratas, ratones, hamsters, conejos, perros, gatos, cerdos de guinea, murciélagos y primates han sido experimentalmente infectados con *T. rangeli* (Guhl y Vallejo, 2003).

Se ha observado que los triatomíneos (particularmente del género de *Rhodnius*) son susceptibles a las cepas de *T. rangeli* teniendo el mismo origen geográfico. Varias cepas de *T. rangeli* han mostrado una sobrevivencia variable en diferentes especies de *Rhodnius* (Guhl y Vallejo, 2003). Los efectos patológicos de *T. rangeli* en *R. prolixus* fueron observados por primera vez por Grewal (1956, 1957). El autor observó un aumento de hemolinfa y deformidades en el proceso de muda lo cual lleva a una alta mortalidad.

A pesar de que *T. rangeli* no es patógeno para humanos, se ha demostrado su presencia en infecciones humanas por examinación directa, hemocultivo o xenodiagnóstico, dejando más de 2,600 casos de infecciones registradas siendo 1,117 en Guatemala (Guhl y Vallejo, 2003).

T. rangeli presenta similitudes con antígenos de superficie de *T. cruzi*, dando así diagnósticos incorrectos de la enfermedad de Chagas cuando se llevan a cabo estudios serológicos. Sin embargo, considerando que *T. rangeli* es altamente pleomórfico, su identificación morfológica es difícil, siendo identificado incorrectamente como *T. cruzi* en ensayos microscópicos (Urdaneta-Morales & Tejero 1992). No es fácil diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli* en las disecciones de los vectores, especialmente en las formas de epimastigotes. Dorn et. al 1999 reportaron un mal diagnóstico de *T. rangeli*, comparando la disección tradicional con la técnica de PCR en *R. prolixus* en Guatemala (Monroy, et. al. 2003). Esto lleva a la importancia de la identificación de *T. rangeli* en las muestras de los vectores.

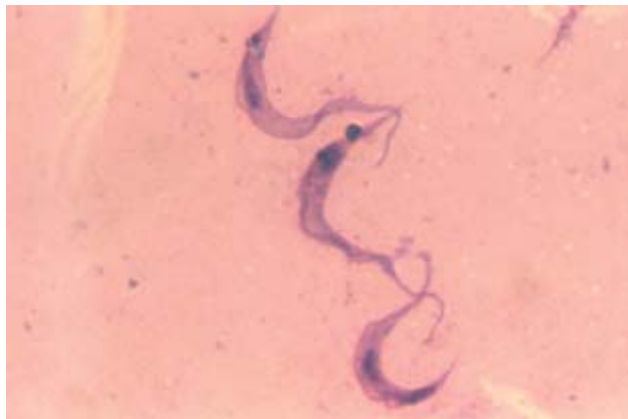
E. Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es una especie heterogénea que consiste en varias sub-poblaciones del parásito circulando entre vertebrados domésticos y selváticos e invertebrados. La variación intraespecífica entre *T. cruzi* se ha observado basado en:

- La sobrevivencia biológica de cepas en animales de laboratorio.
- Características bioquímicas
- Características moleculares (Devera, Fernandes y Rodriguez, 2003).

- Estudios evolutivos

Figura 9 : *Trypanosoma rangeli*.



Se observan dos tripomastigotes y un epimastigote. Aislados de hemolinfa de *Rhodnius prolixus* infectado experimentalmente. Giemsa, 100X. (Tomado de: Mejía, Paláu y Zuñiga, 2004)

Debido a que *T. cruzi* está compuesto de poblaciones heterogéneas, el mismo hospedero puede estar simultáneamente infectado por diferentes cepas (Devera, Fernandes y Rodríguez, 2003). Una hipótesis sugiere que la heterogeneidad y la multiclonalidad de una cepa determina un tropismo de tejido, resultando en variaciones en la presentación clínica de la enfermedad (Andrade, 1999). Una correlación entre la diversidad genética de *T. cruzi* y su patogenicidad fue propuesta como el modelo clonal histotrópico que está basado en la heterogeneidad y multiclonalidad. (Macedo, *et. al.* 1992, Oliveira, *et. al.* 1998, 1999, Macedo & Pena 1998). Para caracterizar una cepa usando esta técnica es necesario aislar *T. cruzi* a través de inoculación de un animal de laboratorio, xenodiagnosís o cultivo *in Vitro*. Estos análisis pueden llevar a la selección de subpoblaciones específicas del parásito que estaba presente en el inóculo original. Debido al distinto tropismo de varias cepas, los clones circulantes y por lo mismo disponibles para hemocultivo pueden ser diferentes de aquellos causantes de lesión de tejidos, apoyando así el modelo clonal histotrópico de la enfermedad de Chagas (Macedo & Pena, 1998).

1. Caracterización bioquímica. La caracterización de las cepas de *T. cruzi* se puede realizar por medio de métodos bioquímicos que permiten analizar los productos de expresión génica utilizando isoenzimas.

a. Electroforesis enzimática. La electroforesis de isoenzimas es uno de los métodos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares, pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos.

Dos décadas atrás Miles, *et. al.* (1977, 1978) propusieron, basado en perfiles electroforéticos de las enzimas aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato deshidrogenasa (MDH), glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) y fosfoglucomutasa (PGM), que las diferentes cepas de *T. cruzi* se podían dividir en tres zimodemos distintos: Z1, Z2 y Z3, definiendo así la diversidad dentro del taxón *T. cruzi*. Zimodemo 1 (ahora TCI) fue descrito que pertenecía al ciclo selvático, estando principalmente asociado con zarigüeyas. Los aislados de ambientes domésticos (triatominos, mamíferos y humanos), en regiones donde los síntomas de la enfermedad de Chagas eran comunes, se agruparon en zimodemo 2 (TCII). Zimodemo 3 fue definido como un grupo de población especial de áreas selváticas de la cuenca del Amazonas, asociado con el parasitismo de armadillos y *Panstrongylus geniculatus* y muy pocas infecciones humanas (Fernandes, *et. al.* 1999, 2001, Macedo, *et. al.* 2004).

Posteriormente se identificaron cuatro grupos isoenzimáticos (ZA, ZB, ZC y ZD) analizando ocho enzimas (Carneiro, *et. al.* 1990).

2. Caracterización molecular. Los marcadores moleculares refuerzan la heterogeneidad de la población de *T. cruzi*, permiten la división de las cepas de *T. cruzi* en dos grupos o linajes, uno que circula en el ciclo selvático y otro en el ciclo doméstico, dan evidencia de la diploidia e intercambio genético en *T. cruzi* y hasta cierto punto pueden asociar la susceptibilidad a drogas de cierto fenotipo del parásito (Fonseca y Romanha, 1999).

a. Análisis de Esquizodemos. El Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) de genoma mitocondrial (ADN del kinetoplasto-ADNk) o análisis de esquizodemos es una técnica no requiere un cultivo previo de los parásitos. Los primeros estudios de polimorfismo de ADN en *T. cruzi* fue publicado en 1980 por Morel *et. al.* quienes reportaron en RFLP de ADNk de minicírculos. Ésta técnica está basada en la separación electroforética de los fragmentos de restricción del ADNk. Las poblaciones de parásitos demostraron patrones de restricción de ADNk del minicírculo iguales o muy similares los cuales se llamaron esquizodemos. La restricción de ADNk demostró que las cepas de *T. cruzi* podrían contener dos o más clones distintos (Devera, Fernández y Coura, 2003; Macedo, *et. al.* 2004).

b. Análisis RAPD. Desde su introducción en 1990, esta técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés) ha sido utilizada en taxonomía y en estudios de tipificación de microorganismos. Es una técnica mediada por PCR que usa cebadores cortos de secuencias al azar, los cuales pueden amplificar fragmentos del ADN blanco, generando múltiples patrones de bandas que pueden ser específicas de cepa. Las ventajas de esta técnica es que requiere mínima cantidad de ADN blanco, acepta un número ilimitado de cebadores y no requiere el conocimiento previo de la secuencia a amplificar. El análisis RAPD para *T. cruzi* es una herramienta para obtener marcadores de ADN altamente variables que permiten establecer relaciones genéticas entre aislados. Por esta técnica se observa que *T. cruzi* como taxón está dividido en dos grupos, los cuales corresponden a *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. (Devera, Fernández y Coura, 2003).

c. Análisis de RFLP-ITS-ADNr. Los genes de ADN ribosomal (ADNr) son altamente conservados y presentan potencial para el análisis filogenético de tripanosomas. En estos parásitos, el ADNr se encuentra en secuencias repetidas. Las regiones codificantes de las subunidades grandes y pequeñas están separadas por espaciadores transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés) que flanquean el gen 5.8S ARNr. Las ITS presentan gran variabilidad, son flanqueadas por segmentos altamente

conservados lo cual permite diseñar cebadores de PCR que se hibridicen en estas regiones (Cupolillo et. al 1995, Fernandes, et. al. 1999). Cupolillo et. al. estandarizaron el RFLP del ADNr ITS de *Leishmania*, el cual fue llamado Tipificación de Región Intergénica(IRT), en los cuales los productos de amplificación corresponden al gen ARNr 5.8S mas las dos regiones flanqueantes ITS(Cupolillo, et. al. 1995)

Variación en la secuencia de ITS ADNr probó que la metodología permite distinguir entre especies de *Leishmania*. Esta método fue adaptado y aplicado para la caracterización molecular de cepas de *T. cruzi* (Fernandes, et. al. 1999). Resultados preliminares mostraron que el RFLP-ITS ADNr es poderoso para distinguir variabilidad intra-específica en *T. cruzi*. Esto también confirmó la división del taxón en dos grupos principales. (Devera, Fernández y Coura, 2003).

d. Microsatélites. Los microsatélites son una clase de ADN repetitivo arreglados en tandem de 1-6 pb que están dispersas en el genoma eucariota. Pueden ser clasificados de acuerdo al número de bases y ser llamados entonces mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos. El número de copias de la unidad repetitiva en un locus específico polimórfico y la variación en el número de repeticiones ocurren también entre los alelos. El rango de mutación de los microsatélites varía de 10^{-6} - 10^{-2} . Este rango varía de acuerdo al número de repeticiones en el arreglo. Debido al polimorfismo, los microsatélites son considerados marcadores de elección con grandes aplicaciones en áreas biomédicas, genética de poblaciones y filogenia. La estrategia principal empleada en el análisis de polimorfismo de microsatélites es la amplificación de PCR del locus, usando un par de cebadores específicos que flanquean el segmento que contienen las repeticiones, seguido de un análisis de los tamaños de los segmentos generados (Devera, Fernández y Coura, 2003).

Para *T. cruzi* el análisis de microsatélites ha usado para el estudio de genética de poblaciones y reconstrucción filogenético y para definir la clonalidad de cierta cepa. La metodología fue originalmente desarrollada por Oliveria et. al. 1998 como una técnica basada en PCR que amplifica loci polimórficos del microsatélite con repeticiones citosina-adenina(CA) del genoma de *T. cruzi*. La metodología fue luego incrementada

con el uso de cebadores fluorescentes en el PCR y análisis de los fragmentos en un secuenciador automático para determinar el tamaño de los alelos. Este ensayo demostró que las cepas de *T. cruzi* son diploides y multiclonales. Las cepas que muestran 1 ó 2 picos son considerados monoclonales (1 ó 2 alelos corresponden a diploidia). Cuando aparecen más de dos picos en loci diferentes, es indicativo que más de una población está presente (policlonalidad) (Devera, Fernández y Coura, 2003).

En Guatemala, Rivera (2003) identificó locus correspondientes a microsatélites polimórficos en el genoma del *T. cruzi*. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar 11 locus, de los cuales tres (MS3, MS5 y MS6) mostraron polimorfismo. Luego estos tres se amplificaron usando aislados de *T. cruzi* provenientes de *T. dimidiata*, *R. prolixus* y *R. pallenscens*; así como reservorios y humanos; éstos 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. Los resultados, basados en más de dos picos en electroferograma sugirieron una mezcla de parásito o poliploidismo. Diferencias entre valores de heterocigosidad esperada y observada revelaron un fuerte desequilibrio de Hardy Weinberg, lo cual puede apoyar a Oliveira, *et. al.* 1998 indicando una reproducción sexual escasa o ausente. Si embargo no se puede descartar la idea de que los bajos valores de heterocigosidad observada se deban a un alto número de alelos nulos (Rivera, 2003).

e. Gen del Mini-exón. El gen del mini-exón (ME) está presente en el genoma nuclear de los Kinetoplastida en cerca de 200 copias arregladas en secuencias repetidas en tandem, que consisten en tres regiones distintas: exón, intrón y regiones intergénicas. El exón es una secuencia de 300pb, altamente conservado entre los componentes del Orden, siendo agregado post-transcripcionalmente a todos los ARN mensajeros nucleares (ARNm). El intrón es moderadamente conservado entre especies del mismo género o sub-género y la región intergénica o espaciador no transcrito (NTS-ME) es particularmente distinto entre especies. En relación a *T. cruzi* en particular, un sitio hipervariable del NTS-ME puede ser amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), haciendo posible clasificar distintos aislados en dos grupos taxonómicos principales: *T. cruzi* I(TCI) y *T. cruzi* II(TCII). Últimamente se ha

propuesto un ensayo más práctico para tipificar las cepas de *T. cruzi* usando un PCR múltiplex basado en NTS-ME, permitiendo determinar si cierto aislado es TCI, TCII, *T. cruzi* zimodemo 3(Z3) o si existe presencia de *T. rangeli* (Devera, Fernandes y Rodríguez, 2003).

Según el análisis del ARNr 24Sα y Gen del Mini-Exón, las cepas de *T. cruzi* indican un dimorfismo claro, y se clasifican en dos grupos mayores llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, que corresponden a Z1 y Z2 y a linaje 2 y linaje 1 respectivamente. El Z3 fue definido como una forma distinta, pero más relacionado con Z1 (Cuadro 1) (Fernandes, *et. al.* 1998).

Estudios realizados en muestras recolectadas de humanos y triatomíneos de áreas geográficas de Brasil, demostraron la presencia de los grupos, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, en los cuales se sugiere que TCI tiene preferencia al ciclo selvático, y más adaptados a marsupiales y triatomíneos selváticos y es ocasionalmente aislado de humanos, mientras que TC II es asociado a primates y usualmente encontrado en infecciones humanas. (Fernandes, *et. al.* 1998,1998a, 1999, 2001).

Un estudio realizado en México y Guatemala en donde se analizaron 16 muestras aislados de casos humanos y 4 aislados de triatomíneos; 6 aislados provenientes de Guatemala: 3 de pacientes con caso agudo, 1 de un paciente asintomático y 2 de triatomíneos, Los parásitos fueron cultivados en medio LIT enriquecido con 10% de suero fetal bovino. Utilizando el gen del Mini-Exón se encontró que las 6 muestras de Guatemala pertenecían a TC I, así también como las 14 muestras de México. Estos resultados sugieren que existen diferencias en la epidemiología fuera de América del Sur (Ruíz-Sánchez, 2005).

Otro estudio realizado en Panamá con 71 muestras aisladas de *R. pallescens*, 67 colectadas en palmas en un ambiente selvático y de palmas en áreas peridomésticas encontrados al menos a 100m de casas, y 4 encontradas en casas, en donde los parásitos fueron inoculados en ratones y luego cultivados en LIT, se encontró que todos los aislados pertenecen a TC I utilizando tanto con el gen del mini-exón y secuencias teloméricas. También se encontró TC I en dos casos agudos de perros y una zarigüeya de áreas endémicas y en 26 muestras de hemocultivos de casos humanos. Esto sugiere que en Panamá en principal genotipo circulante los ciclos selváticos y

doméstico/peridoméstico es TCI y el cual es responsable por la enfermedad en dicho país. Sin embargo en este estudio no se descarta la presencia de otros genotipos diferentes a TCI ya que los reservorios pueden estar actuando como filtros naturales, seleccionando sub-poblaciones de parásitos (Sousa, *et. al.* 2006, Samudio, *et. al.* 2007).

Cuadro 1: Diferentes clasificaciones propuestas para *T. cruzi*

| <i>T. cruzi</i> I | <i>T. cruzi</i> II | Otros grupos | Método de clasificación |
|-------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Z1 ^a | Z2 | Z3 | MLEE ^b |
| Ribodemo II/III | Ribodemo I | | rRNA ^c |
| Linaje 2 | Linaje 1 | Grupo ½ rRNA | rRNA, Mini-exón |
| Riboclado 2 | Riboclado 1 | Riboclado 3 y 4 | rRNA, Mini-exón |
| Grupo II | Grupo I | | rRNA, Mini-exón |
| DTU1 ^d | DTU2b,e | DTU2a,c y d | MLEE, RAPD ^e |
| Clado A | Clado C | Clado B | ADN intergénico |
| <i>T. cruzi</i> I | <i>T. cruzi</i> IIb,e | <i>T. cruzi</i> IIa, c y d | Tamaño cromosoma |

^a Zimodemo, ^b electroforesis enzimática de varios locus, ^c ARN ribosomal, ^d Unidad discreta de tipificación (DTU por sus siglas en inglés), ^e ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés) (Tomado de Buscaglia y Di Noia, 2003).

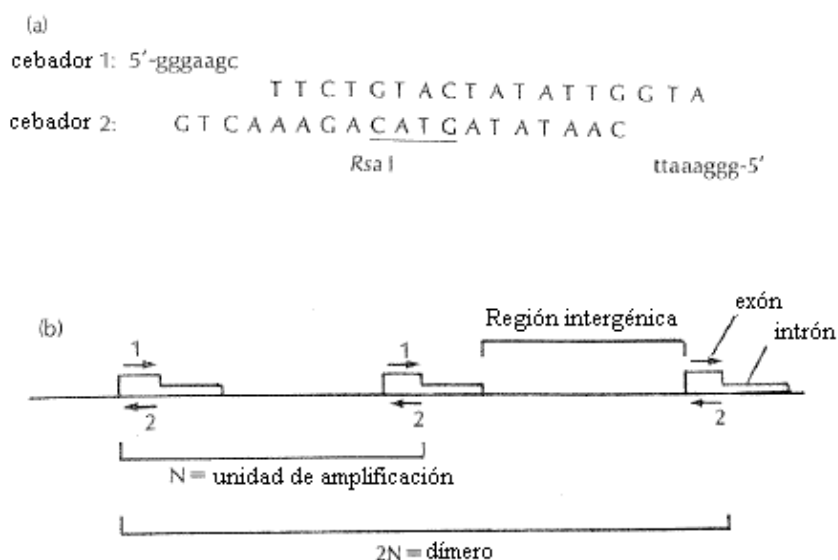
En un estudio realizado en Venezuela utilizando marcadores ribosomales y el gen de mini-exón se analizaron 23 muestras de pacientes chagásicos con caso agudo. Los parásitos se cultivaron en medio LIT con 10% de suero fetal bovino. Los resultados demostraron que 6 muestras (26%) fueron TCII y 17 (74%) TCI, lo cual indica la prevalencia de TCI en el ciclo doméstico (Anez, *et. al.* 2004).

1). Detección utilizando el gen del mini-exón. Previamente se desarrolló un PCR para diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*. En dicho estudio se diseñaron dos cebadores para amplificar repeticiones del gen del mini-exón, dichos cebadores contienen a una secuencia de 22 nucleótidos conservados encontrados

dentro del gen del mini-exón (ME) de todos los Kinetoplastida (Figura 10 a). Dichos cebadores se traslapan y permiten amplificar unidades repetitivas (y repeticiones múltiples) del gen del mini exón altamente repetitivo en tandem. Los tamaños esperados de amplificación son de 582pb (N) o 1164pb (2N) (Figura 10 b). (Murthy, Dibbern y Campbell, 1992).

Posteriormente se desarrollo un PCR múltiplex en el cual se utilizan tres cebadores derivados de una región hipervariable de la repetición del mini-exón de *T. cruzi* (TC1: 5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G, TC2: 5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCA T y TC3: 5'-CCG CGA ACA ACC CCT AAT AAA AAT G) y un cebador de una región específica del espaciador no-transcrito de *T. rangeli* (TR: 5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G) usados como cebadores 5'-3'(sentido). Un cebador, que corresponde a secuencias presentes en la mayoría de regiones conservadas del gen del mini exón (ME: 5' TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G), se usó como cebador 3'-5' (antisentido) en la reacción múltiple (Figura 11). Los tamaños esperados de amplificación son 250bp para *T. cruzi* II, 200pb para *T. cruzi* I, 150pb para *T. cruzi* Z3 y 100pb para *T. rangeli* (Fernandes, *et. al.* 2001).

Figura 10. Esquema de la amplificación del gen del mini exón.



- a) Cebadores 1 y 2 indicando la simetría interna y el sitio de restricción interno para Rsa I. Las letras en mayúscula indican la secuencia complementaria al gen del miniexón.

Las letras en minúscula representan nucleótidos adicionales que confieren un sitio de restricción para Hind dIII en el cebador 1 y para Eco R1 en el cebador 2.

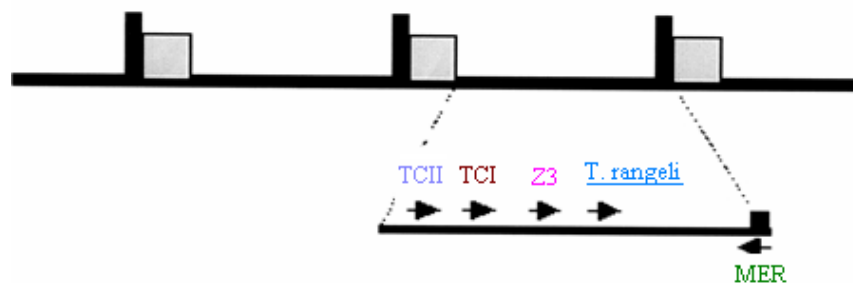
- b) Representación del ME mostrando la región del exón (caja larga abierta), la región del intrón (caja pequeña abierta) y la localización de los primers. La línea simple representa la región intergénica. La unidad de amplificación N varía en largo. (Tomada y adaptada de: Murthy, Dibbern y Campbell, 1992).

F. Análisis evolutivo

Debido a la ausencia de registros fósiles de tripanosomas, el único modo de estimar los tiempos de divergencias es a través de datos moleculares.

1. Hipótesis evolutiva de Gaunt & Miles, 2000. Observaciones acerca de la amazona en Brasil y en cualquier otro lugar proveen evidencia de que varias especies de triatominos están adaptados a sus ecótopos naturales. Algunas especies de triatominos como *Rhodnius prolixus* y *Pastrongylus megistus* son eclécticos en su alimentación, sin tener hospederos obligados, esto sugiere la adaptación de especies de triatominos a distintos nichos, lo cual implica una larga historia evolutiva, así como una reciente expansión de algunas pocas especies, eclécticas y domiciliarias (Gaunt & Miles, 2000).

Figura 11. Esquema de PCR múltiplex para detección de linajes de *T. cruzi* y *T. rangeli*



Representación del mini exón mostrando la región del exón (cajas negras), intrones (cajas grises) y el espaciador no transcrito (línea negra conectora) (Tomada y adaptada de: Macedo y Pena, 1998).

Las especies de *Rhodnius* son principalmente asociadas con hábitats en árboles de palma (Lent & Wygodzinsky 1979, Miles 1979, Carcavallo, *et. al.* 1998). *Rhodnius* se ha adaptado a vivir en las palmas, con órganos que les permiten escalar y asistir el movimiento entre los troncos, los cuales son particularmente lisos en varias especies de palmas. La distribución de *Rhodnius* selvático en América Latina ampliamente coincide con la distribución de las palmeras. El género *Rhodnius*, tiene una historia de evolución en palmeras en América Latina (Gaunt & Miles, 2000).

Un estudio de los hábitats de especies del género *Triatoma* (Miles, 1979) revelan que al menos 20 especies de *Triatoma* están asociadas con hábitats terrestres rocosos o madrigueras de roedores. Esto sugiere que el género *Triatoma* ha evolucionado predominantemente en hábitats terrestres rocosos. Gaunt & Miles concluyen que hay una cercana pero no absoluta asociación entre árboles de palma, especies de *Rhodnius*, *T. cruzi* I y *Didelphis*. Así también que hay una fuerte asociación entre *T. cruzi* II, *Triatoma* y roedores y hábitat terrestre; y que Z3 puede ser primariamente asociado con el hábitat terrestre (Cuadro 2). La preferencia de *Rhodnius* y *Triatoma* están reflejadas en su distribución dentro de casas infectadas. *R. prolixus* puede infestar grandemente los techos de palmas (Gaunt & Miles, 2000), mientras que *Triatoma* tiende a estar en casas de adobe o suelo de tierra.

Se ha sugerido un vínculo entre *T. cruzi* I y *Didelphis* y ente *T. cruzi* II y roedores y primates. Los primeros mamíferos que habitaron Sur América fueron los marsupiales, y los mamíferos placentales edentados (armadillos, perezosos y osos hormiguero) hace cerca de 65 millones de años. Evidencia fósil indica que los roedores, primates y murciélagos llegaron 25 millones de años después. Además los roedores y primates probablemente llegaron a Sur América de África, mientras que los marsupiales y edentados migraron hacia el sur desde Norte América. Evidencia molecular sugiere que *T. cruzi* I y *T. cruzi* II divergieron entre 88-37 millones de años atrás (Briones et al. 1999). Si *T. cruzi* II está más asociado con roedores y primates esto implica una historia más reciente de evolución que la de *T. cruzi* I. Basado en esto Gaunt & Miles sugieren lo siguiente para la historia evolutiva de *T. cruzi* I, *T. cruzi* II y Z3:

- *T. cruzi* I ha evolucionado en árboles de palma con la tribu Rhodniini y también con asociación a la zarigueya *Didelphis*,

- ambos *T. cruzi* II y Z3 evolucionaron en un hábitat terrestre en madrigueras y lugares rocosos, con la tribu Triatomini, en asociación con edentados y posiblemente marsupiales. (Cuadro 3) (Gaunt & Miles, 2000)

Cuadro 2: Hábitats de triatominos, hospederos y tripanosomas

| Triatomo | Ecótopo selvático | Trypanosoma asociado | Hospederos asociados |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------------|--|
| Especies de <i>Rhodnius</i> | Arborícola: palmas | <i>Trypanosoma cruzi</i> I (Z1) | Marsupial (<i>Didelphis</i>) |
| | | <i>T. rangeli</i> | Marsupial (<i>Didelphis</i>) |
| <i>Triatoma</i> | Terrestre: rocas | <i>T. cruzi</i> II (Z2) | Edentados ^a Roedores Primates |
| <i>Panstrongylus</i> | Arborícola: no palmas | <i>T. cruzi</i> I (Z1) | <i>Didelphis</i> |
| <i>Panstrongylus</i> | Terrestre: madrigueras | <i>T. cruzi</i> Z3 | Edentado(<i>Dasybus</i>) Marsupial (<i>Monodelphis</i>) |

a: edentados propuestos como hospederos originales

(Adaptado de Gaunt & Miles, 2000)

Entonces los edentados pueden ser los hospederos principales de *T. cruzi* II y Z3 y ambos son las principales subdivisiones que *T. cruzi* pudo tener en Sur América hace mas de 65 millones de años y ambos evolucionaron en Sur América. Si esta hipótesis es correcta, *T. cruzi* II llegó a los roedores luego de compartir un ecótopo terrestre con edentados, y los primates pueden representar un hospedero secundario. Una hipótesis alternativa es que no hay asociación entre *T. cruzi* II y edentados y que todos las

poblaciones de *T. cruzi* II son mas recientemente derivadas de *T. cruzi* I por transferencia de hospederos entre roedores, edentados y primates. (Gaunt & Miles, 2000).

Cuadro 3: Hábitats y asociaciones propuestas para las mayores subdivisiones de *Trypanosoma cruzi* (I y II)

| | | |
|-------------------------------|----|---|
| <i>T. cruzi</i> I (Marsupial) | Z1 | Evolucionó con <i>Didelphys</i> y <i>Rhodnius</i> en un ecótopo arborígena (palmas) |
| <i>T. cruzi</i> II (Edentado) | Z2 | Ambos evolucionaron |
| | Z3 | inicialmente con edentados y <i>Triatoma</i> en un ecótopo terrestre |
| <i>T. cruzi</i> II | Z2 | Alcanzo roedores por compartir ecótopo terrestre con edentados |

(Adaptado de Gaunt & Miles, 2000)

T. rangeli es exclusivamente asociado con triatominos *Rhodnius*, en los cuales *T. rangeli* puede llegar a las glándulas salivales para ser transmitidos por una mordedura y no por contaminación fecal. Un hospedero común de *T. rangeli* es *Didelphis*, y la distribución geográfica de *T. rangeli* ampliamente corresponde con las de especies de *Rhodnius* y *Didelphis*. Por lo mismo se propone que al igual que *T. cruzi* I, *T. rangeli* ha evolucionado de árboles de palma con *Rhodnius* y con *Didelphys* (Gaunt & Miles, 2000)

La ocurrencia de *T. cruzi* infectivos (metacíclicos) en la glándula anal de la zarigueya *Didelphis* sugiere que *T. cruzi* pudo haber sido transmitida directamente de marsupial a marsupial sin un vector triatomino. En este caso, los triatominos podrían haber adquirido la infección con *T. cruzi* sólo luego de que *T. cruzi* haya evolucionado como un parásito sanguíneo de los marsupiales. 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).

2. Hipótesis evolutiva según Kawashita, *et. al.* 2001. Kawashita, *et. al.*

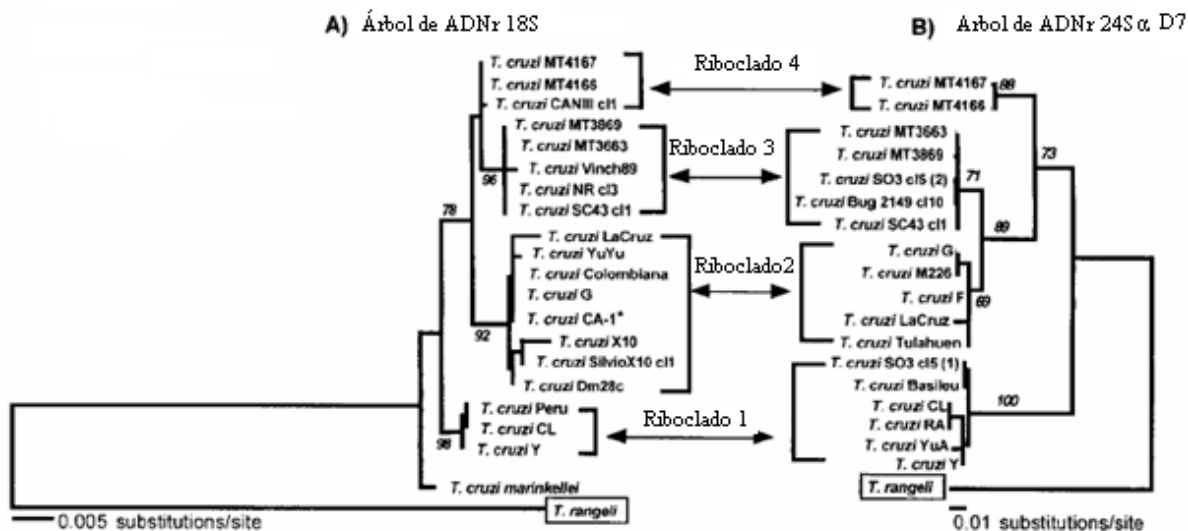
2001, estudiaron la evolución de cepas de *T. cruzi* basados en un análisis filogenético (“maximum-likelihood) de las secuencias de ADNr 18S y ADNr D7-24Sα (D7-24S) de 20 cepas, e identificaron cuatro subgrupos los cuales nombraron Ribocladados (Figura 12).

Los resultados de la figura 12A sugieren cuatro grupos, nombrados ribocladados 1, 2, 3 y 4. Esto sugiere que *T. cruzi* tiene una dicotomía basal la cual separa el riboclado 1 de los ribocladados 2, 3 y 4. Los ribocladados pertenecen a subgrupos caracterizados por otros métodos moleculares, riboclado 1 (*T. cruzi* II) es predominante encontrada en el ciclo doméstico, cepas del riboclado 2 (*T. cruzi* I) y Riboclado 4 (Zimodemo 3) se han asociado con el ciclo selvático del parásito y se han aislado principalmente de zarigüeyas, roedores salvajes y triatomíneos (Miles & Cibulskis 1986; Zingales, *et. al.* 1998; Fernández, *et. al.* 2001). Posiblemente la variabilidad encontrado entre los ribocladados 2, 3 y 4 podría explicar la evolución y distribución de hospederos mamíferos específicos y de los insectos vectores, triatomíneos, que evolucionaron en América del Sur durante el Cenozoico (Marcilla, *et. al.* 2001). El grupo ½ caracterizado por Souto *et. al.* pertenece al riboclado 3, este grupo ½ pudo haberse originado de una transferencia eventual de ADNr de cepas del grupo 2 al grupo 1, por transferencia horizontal o reproducción (Carrasco, *et. al.* 1996).

Kawashita *et. al.* proponen que los ribocladados 2 (*T. cruzi* I), 3 y 4(Z3) evolucionaron en los marsupiales de América del Sur, aislados de placentales de América del Norte, parasitados por riboclado 1(*T. cruzi* II), durante la mayoría del Cenozoico (Figura 13).

El ancestro hipotético de los ribocladados 1, 2, 3 y 4 se esparció en Norte y Sur América hace 84.4 millones de años atrás, durante el período cuando el aislamiento geográfico de América del Sur y el Viejo Mundo no eran una barrera para la migración de mamíferos.

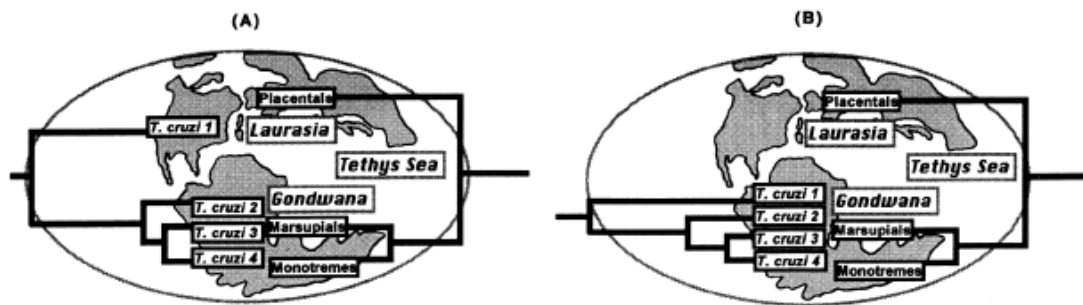
Figura 12. Filogenia de cepas de *T. cruzi* basado en análisis genético de secuencias ADNr 18S y la región D7 de secuencias ADNr 24S α .



(Tomado y adaptado de Kawashita, *et. al.* 2001)

Cuando América del Sur se separó en el Cenozoico, la fauna estaba compuesta de marsupiales, edentados y ungulados. *T. cruzi* no infectó a los ungulados grandes, como las vacas y caballos, lo cual posiblemente restringió a *T. cruzi* en América del Sur a hospederos marsupiales y edentados. De acuerdo a esta hipótesis, el riboclado 1 pudo haber entrado de América del Sur durante el Oligoceno junto con roedores y primates que migraban de isla a isla, o durante el gran intercambio de fauna durante el Plioceno-Pleistoceno, cuando Sur y Norte América se conectaron por el istmo de Panamá (Figura 12 B) (Kawashita *et al.*, 2001). En América del Norte la asociación entre el riboclado 1 y los mamíferos placentales y riboclado 2 y marsupiales es fuerte y puede ser evidencia de evolución independiente de estos dos ribocladados por un largo período de tiempo (Clark y Pung, 1994). El marsupial *Didelphys virginiana* de América del Norte, es de origen de América del Sur; posiblemente los ancestros de estos mamíferos introdujeron a *T. cruzi* riboclado 2 en América del Norte durante el intercambio de fauna (Briones, *et. al.* 1999).

Figura 13. Hipótesis de la evolución de Riboclados de *T. cruzi* y mamíferos



- A) El riboclado 1 de *T. cruzi* pudo haber evolucionado por separado durante 84 millones de años y luego de la reconexión de las Américas en el Pleistoceno-Plioceno, los mamíferos placentales que invadieron América del sur introdujeron *T. cruzi* riboclado 1.
- B) Los riboclados de *T. cruzi* pudieron haber divergido dentro de América del Sur durante el final del Cretáceo y el Cenozoico, posiblemente coevolucionando con insectos vectores, placentales como también roedores y primates que se infectaron luego de la invasión de América del Sur hace 37 millones de años o durante el intercambio de fauna en el Pleistoceno-Plioceno con América del Norte (Tomado de Kawashita, *et. al.* 2001).

Otra alternativa es asumir una razón de evolución mas rápida (4% de divergencia por 100 millones de años) para el ADNr 18S en *T. cruzi*. Esto sugiere que la divergencia de las cepas ocurrió recientemente (menos de 18 millones de años) y que puede ser resultado de la coevolución con los insectos vectores o las barreras geográficas dentro de América del Sur lo cual aisló a los marsupiales y placentales que llevaban *T. cruzi* II (Kawashita, *et. al.* 2001).

G. Quimioterapia

El agente tripanocida ideal debería ser: a) selectivo y potente, tanto contra los amastigotes intracelulares como contra los tripomastigotes extracelulares; b) de acción tripanocida rápida y completa; c) efectivo para impedir la evolución de las formas agudas e indeterminadas de la infección; d) inocuo para la persona tratada y no debe producir efectos deletéreos, y e) no debe inducir resistencia del parásito al medicamento (Stoppani, 1999).

Su farmacodinamia debe alcanzar niveles efectivos tripanocidas de concentración de la droga en el plasma sanguíneo, en fluidos biológicos y en tejidos. Su modo de acción debe ser estable y, de preferencia, efectivo por vía de administración oral. El tratamiento de las infecciones producidas por *T. cruzi* es considerado como uno de los más insatisfactorios. Aunque ya se han descrito variaciones en cuanto a la susceptibilidad del parásito al nifurtimox y al benznidazol en ratones infectados crónicamente con diferentes cepas de *T. cruzi*, sería importante conocer la prevalencia de las distintas cepas y su respuesta a los medicamentos disponibles (Stoppani, 1999).

Los fármacos ensayados como antichagásicos se pueden clasificar de la siguiente manera: a) fármacos con utilidad clínica reconocida: Nifurtimox y Benznidazol; b) fármacos efectivos en modelos experimentales *in vivo*, sin aplicación clínica generalizada: Ketoconazol, Itraconazol, Allopurinol, pirazol-pirimidinas, Anfotericina B; c) fármacos efectivos en modelos experimentales con utilidad clínica previsible: péptidos inhibidores de la cisteína-proteasa del *T. cruzi* (cruzipaina, cruceína) (Stoppani, 1999).

1. Nifurtimox y Benznidazol. El Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril)metilene]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dioxido; y el Benznidazol(2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida; (Fig.14), reemplazaron a otros nitrofuranos como la furadantina, la nitrofurazona y la furaltadona, menos activos como agentes tripanocidas. Numerosos clínicos han utilizado al Nifurtimox y al Benznidazol desde su introducción en la terapéutica antichagásica hasta comienzos de la presente década. En general, se acepta que el Nifurtimox y el Benznidazol son eficaces en la fase aguda de la infección chagásica pero lo son menos en la fase crónica pues a menudo, no producen cura parasicológica (Stoppani, 1999).

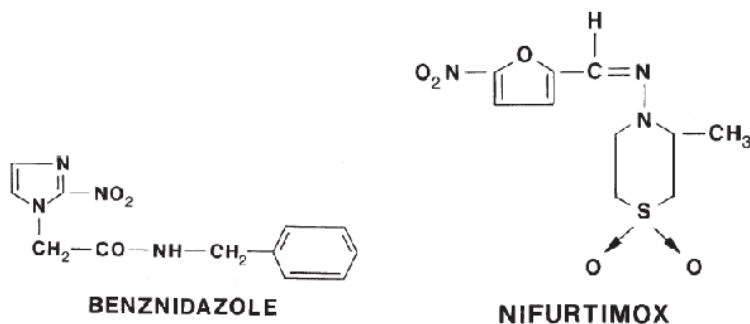
Los efectos terapéuticos del Nifurtimox y del Benznidazol en la infección chagásica humana, presentan diferencias notables, lo que ha motivado controversias. Esas diferencias se explicarían, en parte por la existencia de cepas de *T. cruzi* con distinta susceptibilidad (o resistencia) a los fármacos, lo que constituye un problema biológico de gran interés. Por ejemplo, las cepas Tulahuen, Y y P son susceptibles al Nifurtimox mientras que las cepas Sonya y Colombiana no lo son. Las diferentes respuestas del *T.*

cruzi a los fármacos sugieren la existencia de diferencias moleculares entre las varias cepas del parásito. (Stoppani, 1999).

Estudios demuestran que las cepas de TCI son más resistentes al benznidazol que las cepas del TCII. Por ello que la susceptibilidad/resistencia de la cepa infectante sea investigada antes de iniciar la quimioterapia. Es necesaria la investigación molecular de las cepas infectantes en nuestro país. Se debe agregar que poblaciones silvestres de *T. cruzi* pueden contener formas susceptibles y resistentes a los quimioterápicos antichagásicos, de manera que la destrucción de las formas susceptibles por los fármacos, lleva a la producción de formas resistentes. Los epimastigotes resistentes transmiten esa propiedad a los amastigotes correspondientes. De esta manera, la resistencia al fármaco se hace extensiva a todos los parásitos infectantes (Stoppani, 1999).

Tanto el Nifurtimox como el Benznidazol producen efectos adversos (“no deseados”) en pacientes tratados con esos fármacos, más con el primero que con el segundo. Las manifestaciones tóxicas pueden incluir temblores, náuseas, vómitos, pérdida de peso, polineuropatías, eritema, etc., según el fármaco utilizado. Esos efectos conspiran contra la aceptación de los nitrofármacos por el paciente chagásico. La toxicidad de esos fármacos se ha confirmado en modelos experimentales. Así, se han comprobado acciones genotóxicas en Salmonellas, que correlacionan con la actividad tripanocida *in vitro*. Por otra parte, tanto el Nifurtimox como el Benznidazol producen radicales o moléculas (Stoppani, 1999).

Figura 14. Estructuras del benznidazol y nifurtimox

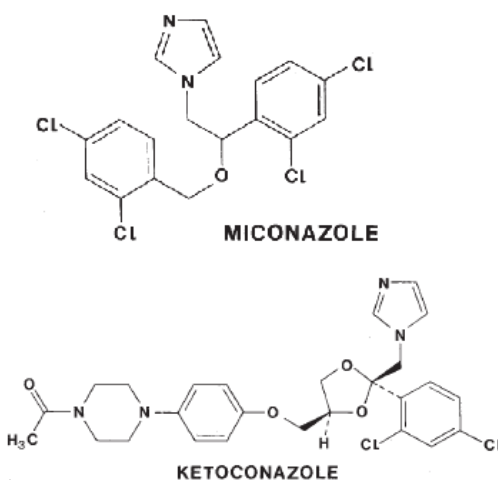


2. Azoles. Los azoles constituyen un conjunto de fármacos caracterizados por poseer un heterociclo nitrogenado (imidazol; triazol, etc) en su estructura (Fig. 15). Son fungistáticos, frecuentemente utilizados para el tratamiento de candidiasis y otras micosis. En 1964 Abitbol y col obtuvieron resultados positivos con la Anfotericina B en pacientes chagásicos de los cuales 4 negativizaron el xenodiagnóstico. Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad de Chagas con Anfotericina B no se repitió, posiblemente por la toxicidad de ese micostático. En 1981 Docampo y col. comprobaron que el Miconazol y el Econazol inhiben el crecimiento del *T. cruzi in vitro* y modifican su contenido en esteroides, en particular de ergosterol, un esteroide vegetal cuya presencia en el *T. cruzi* es notable. La asociación del Ketoconazole con la Terbinafina o con la lovastatina, inhibidores de la síntesis de esteroides, resultó eficaz *in vivo* obteniéndose suma de efectos en un número importante de observaciones. Los azoles modifican el metabolismo de los esteroides en el *T. cruzi*, inhibiendo la enzima C14 Δ 24(25)-esteroide metil transferasa. Como consecuencia de esa inhibición, no se forma ergosterol lo que altera la permeabilidad de las membranas del tripanosoma. La Anfotericina B y la sinefungina producen *in vitro* efectos similares. Contrariamente a los resultados experimentales, el ensayo en pacientes chagásicos del Ketoconazol más Lovastatina o del Itraconazol más Allopurinol, no dio resultados convincentes. Más recientemente han aparecido los bistriazoles antichagásicos, el ICI-195739 y su enantiómero D-0870100,101. Como antichagásicos, estos fármacos son más activos que la sinefungina, pero será necesario esperar los ensayos complementarios para establecer su utilidad clínica. En resumen, si bien algunos azoles como el Econazol, el Ketoconazol y el itraconazol, son parcialmente eficaces como antichagásicos, el éxito de la quimioterapia de la enfermedad de Chagas con azoles está supeditado a los resultados que se obtengan con los nuevos bistriazoles (Stoppani, 1999).

3. Allopurinol y pirazol pirimidinas. El *T. cruzi* es un organismo incapaz de sintetizar purinas (adenina; guanina), pero es capaz de sintetizar pirimidinas (timina; citosina y uracilo). La importación de bases púricas por el *T. cruzi* depende de un transporte específico en el que participan quinasas. Por lo tanto, para sintetizar los nucleótidos que constituyen el DNA y el RNA, el *T. cruzi* debe utilizar purinas

preformadas por el organismo huésped, de manera que, la síntesis de nucleósidos y nucleótidos por el parásito es un buen blanco terapéutico. El *T. cruzi* utiliza la adenina, y la hipoxantina para sintetizar ácido adenílico (AMP) mientras que la guanina y la xantina son utilizadas para sintetizar ácido guanílico (GMP). La conversión de la xantina y la hipoxantina en las bases aminadas depende de enzimas específicas que utilizan al adenil succinato como dador del grupo anión. Esas enzimas podrían también constituir blancos terapéuticos (Stoppani, 1999).

Figura 15: Estructuras del miconazol y ketoconazol



Por otra parte, la síntesis de los nucleótidos púricos es catalizada por la hipoxantina-fosforibosil transferasa y enzimas similares que, pueden utilizar también sustratos no-fisiológicos, por ejemplo, el Allopurinol (4-hidroxi-pirazol-(3,4*d*)-pirimidina) y otras pirazol pirimidinas. Como consecuencia de esas reacciones se forman nucleósidos y nucleótidos no-fisiológicos, que son tóxicos para el parásito pues inhiben la síntesis de los nucleótidos fisiológicos y por consiguiente, la del DNA y el RNA. Esas inhibiciones tienen consecuencias farmacológicas, que se expresan como inhibición de la multiplicación *in vitro*, la reducción de la parasitemia y la prolongación de la sobrevivencia de los ratones infectados según el modelo murino (Stoppani, 1999).

La administración oral de los nucleótidos del Allopurinol o de las pirimidinas análogas también disminuye la parasitemia de ratones infectados pero no produce cura parasitológica. La acción tripanocida varía según la estructura de la base nitrogenada. La síntesis de nucleósidos o nucleótidos artificiales con diferentes pirimidinas, entre ellos 3'-azido-3'-deoxitimidina, (conocido como Zidovudina) produce nucleótidos con acción terapéutica antichagásica. El ensayo de 59 análogos de la purina como inhibidores de la hipoxantina-ribosil transferasa permitió sintetizar 8 moléculas con gran afinidad por la transferasa, estructuras caracterizadas por los grupos sustituyentes en las posiciones 6 y 8 de la purina. (Stoppani, 1999).

El Nifurtimox y el Benznidazol inhiben el transporte de purinas a través de las membranas celulares, lo que puede contribuir a la acción terapéutica. El Allopurinol y sus derivados han sido ensayados para el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Para obtener efectos notables se requieren dosis relativamente altas de Allopurinol lo que puede producir intolerancia. El tratamiento reduce la parasitemia en forma que puede ser total y también negativiza el xenodiagnóstico. Sin embargo, esos efectos suelen ser transitorios y al cabo de cierto tiempo, la sintomatología reaparece. Según Storino, el uso clínico de las purinas requiere respuestas adecuadas a varios interrogantes, a saber: (1) ¿son tripanocidas o tripanostáticos?; (2) ¿cuál es la dosis eficaz y la duración del tratamiento?; (3) ¿en qué momentos del tratamiento se negativizan o se re-positivizan las reacciones serológicas?; (4) ¿qué importancia tienen las cepas de *T. cruzi* resistentes al Allopurinol y análogos? (Stoppani, 1999).

En resumen, el conocimiento del metabolismo de las purinas en *T. cruzi* ha permitido proponer nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado una purina o pirimidina como fármaco eficaz para la cura parasitológica de la enfermedad. Nuevos estudios sobre los mecanismos metabólicos del parásito parecen ser necesarios (Stoppani, 1999).

4. Inhibidores de cisteína proteasas (cruzipaina, cruzaina). El *T. cruzi* se caracteriza por poseer una cisteínproteasa, la cruzipaina (GP59/51) que constituye una fracción importante de las proteínas celulares. La enzima se asemeja a la

papaína y tiene 35-45% de homología con una catepsina I. La cruzipaina se encuentra en todas las formas del parásito, tiene función metabólica esencial y es necesaria para la transformación de amastigotes en tripomastigotes.

Además intervendría en la penetración de los tripomastigotes en las células del huésped. La estructura de la cruzipaina y de su gen la califican como blanco para posibles quimioterapéuticos especialmente, por la reactividad del tiol de la cisteína, susceptible a inhibidores específicos (diazometano y fluorometil acetona). Péptidos sintéticos o pseudopéptidos ligados a grupos diazo o cetona forman una unión estable con el tiol en el centro activo de la enzima. Cuando la estructura peptídica del inhibidor satisface la especificidad molecular del centro activo de la cruzipaina, se forma un compuesto covalente cruzipaina-inhibidor, catalítica-mente inactivo. Estudios con varios péptidos sintéticos han demostrado que los inhibidores más potentes son aquellos que poseen grupos hidrofóbicos voluminosos en la posición P1 (primer residuo vecino al diazometano) y un residuo aromático próximo. Los parásitos afectados por esos inhibidores muestran la membrana plasmática rota, mitocondrias hinchadas y cromatina desorganizada. Los efectos citotóxicos de los péptidos inhibidores de la cruzipaina en amastigotes cultivados también se observan *in vivo*, en el modelo murino. Pseudopéptidos constituidos por fenilalanina y homofenilalanina, ligados a fluorometilacetona, previenen la muerte de ratones infectados con una dosis letal de *T. cruzi*. Algunos ratones son curados parasitológicamente mientras que otros pasan al Chagas crónico. Es llamativo que estos últimos ratones tratados nuevamente con el pseudopéptido también curan. Amastigotes aislados del corazón de los ratones chagásicos tratados con el pseudopéptido presentaron las mismas alteraciones estructurales que los amastigotes aislados de *T. cruzi in vitro*. En cambio, los péptidos no producen patologías en el huésped animal. Se puede ver que los péptidos inhibidores de la cruzipaina perturban la capacidad del *T. cruzi* para invadir miofibras y bloquean la multiplicación de los amastigotes intracelulares (Stoppani, 1999).

En resumen, la obtención de péptidos inhibidores de la cisteína-proteasa constituye un avance significativo para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas por la capacidad de esos péptidos (o pseudopéptidos) para curar el Chagas crónico y por su

inocuidad para el organismo huésped. Esos péptidos podrían constituir el fármaco de elección para el tratamiento de todas las formas de la enfermedad (Stoppani, 1999).

H. Recursos disponibles para ésta tesis

1. Procedimiento para recolección de triatominos. El método que se utilizó fue el de hora-hombre, es decir, sesenta minutos de inspección domiciliar si trabaja una sola persona, treinta minutos si trabajan dos personas y así sucesivamente (el tiempo cambia correspondientemente con el número de persona que simultáneamente trabajan en una vivienda). Para la recolección de triatominos en cada casa a muestrear se sigue el siguiente protocolo:

- a.** Llene el encabezado del formulario respectivo (datos generales: lugar y fecha, tipo de captura, técnico, hora de inicio y final de la colecta, tipo de vegetación circundante, animales domésticos, tipo de construcción, etc.)
- b.** Revise, dentro de la vivienda, todos los refugios posibles, empezando siempre por el lado derecho y siguiendo el recorrido de las paredes hacia la izquierda. Inspeccione las grietas en las paredes, detrás de los cuadros, imágenes o fotografías colgadas en las paredes, ropa doblada, cajas de cartón, muebles, camas, cubiertas plásticas, cerca de donde duermen las personas u animales domésticos, etc.
- c.** Revise si hay exubias, manchas de heces y orina de chinche en las paredes u otros lugares. Anote esta observación en el formulario respectivo.
- d.** Al encontrar un espécimen, recójalo cuidadosamente con una pinza, deposítelo dentro del frasco preparado para ello.
- e.** Para *R. Prolixus*, debe hacer énfasis en la búsqueda en techos de paja o refugios de material natural.
- f.** Observe si hay nidos de animales domésticos dentro de la vivienda. Anote esta información en el formulario.
- g.** Recoja los especímenes muertos y anótelos en el formulario (en el espacio para "observaciones"). Si no puede recoger un espécimen (porque se le escapó u otro motivo), anote esta información.

- h.** Al terminar la colecta, cuente los especímenes colectados. Etiquete el frasco con toda la información pertinente (No. de casa, fecha, especie, estadíos, total colectado, técnico, jefe de familia, etc.)
- i.** Revise si hay Tarjeta de Visitas del Servicio Nacional de Erradicación de la malaria (SNEM), en el caso de no tener coloque una. Registre en ella el trabajo realizado.
- j.** Asegúrese que la información esté debidamente registrada en el formulario, antes de visitar otro casa.
- k.** ES MUY IMPORTANTE que al realizar la colecta, lo haga con mucho cuidado, utilizando el equipo adecuado y las precauciones necesarias, para evitar posibles accidentes o contaminación.

Los triatomos utilizados para este estudio se recolectaron en casas ubicadas en los departamentos de Zacapa, Jalapa y Chiquimula en distintos municipios y localidades seleccionados todos al azar (Ver cuadros 15,16 y 17 en apéndice).

2. Muestras

a. Heces. Los triatomos fueron disectados en el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala. Se realizo un corte transversal de aproximadamente unos 2 mm desde el extremo rectal hacia la parte anterior. Se colocó este extremo suavemente sobre un papel filtro y frotar suavemente (de ser posible) dejando que aproximadamente 1cm^2 se absorba el material. Se dejó secar unas gotas en dos tubos de 1,5mL y guardar a temperatura ambiente (heces preservadas en seco). El resto se colocó en un tubo de 1,5mL presionando muy cuidadosamente para extraer el contenido intestinal. Se diluyó en PBS, se maceró utilizando un pistilo estéril, y observó una gota al microscopio. A las heces preservadas en urea se les agregó urea 8M.

b. Cultivos de tracto digestivo. La infección del triatomo se determinó si se observaron bajo el microscopio parásitos en las heces. Los triatomos infectados fueron disectados bajo campana de flujo laminar La chinche fue empapada con etanol al 70%, para posteriormente ser secada al aire dentro de la campana. Con tijeras y estiletes estériles, se abrió el abdomen en forma anterior-posterior sagital. Los intestinos

fueron removidos con pinzas y se colocaron en tubo eppendorf con 100µl de solución salina de fosfatos amortiguadora (PBS) a pH 7.4 (a concentración final de 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 7mM Na₂HPO₄*7H₂O, y 1.4mM K₂HPO₄). La suspensión de intestinos fue homogenizada con un pistilo estéril. Seguidamente, se agregó 1ml de PBS a pH 7.4 con penicilina/ estreptomycin a 3000 unidades/ml, y se incubó toda la noche a 4° C. Luego, 500 µl del macerado se inocularon en 3ml del medio Infusión de Triptosa e hígado (LIT por sus siglas en inglés “Liver Infusión Tryptose”) y suero bovino fetal al 10%. Este cultivo se observó por un mes, una vez por semana. Cuando el parásito en dicho cultivo llegó a estadio epimastigote, se extrajo una alícuota de 1ml y se hizo extracción total de ADN del parásito por medio del método fenol/cloroformo citado por Ashall (1993). El ADN extraído se almacenó a -20° C (Rivera, 2003).

3. Extracción de ADN de heces preservadas en seco y en urea (Kit Isoquick “Nucleic Acid Extraction”(ORCA, USA). La extracción de las muestras de heces preservadas en seco se realizó en noviembre del 2005, mientras que las heces preservadas en urea se extrajeron en marzo del 2004. Las muestras de heces secas se resuspendieron en 40µl de PBS, se agitaron con vortex y se centrifugaron con quick spin. A los 40 µl de heces resuspendidas se le agregó 40 µl de buffer de lisis 2x con proteinasa K (ver sección Preparación de Reactivos). Se incubó toda la noche a 56° C. La muestra se digirió hirviéndola 15 minutos (colocar seguro en las tapas de los tubos). Se agregó 50µl del reactivo No. 1 de Isoquick (60% tiocianato de guanidina), seguido de 250µl del reactivo No. 2(mezclar bien el reactivo No. 2 antes de su uso). Se agregó 200µl del reactivo No. 3 (0.5% SDS, 0.5% NaCl), se mezcló con vortex 10 segundos y se incubó a 65° C por 10 minutos. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y luego se mezcló con vortex 10 seg. Se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos. La fase acuosa de la superficie se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 250µl del reactivo No.2, se mezcló con vortex 10 seg. y se centrifugó a 12,000 g por 5 min. La nueva fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se estimó el volumen de la solución. Se agregó 0.1 volumen del reactivo No. 4(acetato de sodio) y se mezcló. Se agregó 1 volumen de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se centrifugó a 12,000g por 10 minutos. El sobrenadante se descartó con pipeta y al precipitado se le agregó 500µl de

etanol frío al 70%, se mezcló por inmersión suavemente y se centrifugó a 12,000g por 5 min. Se removió el etanol con pipeta y se dejó secar inclinándolo en una servilleta de papel Kim Wipe dentro de una desecadora. El precipitado se resuspendió 25µl de reactivo No. 5 (agua libre de RNAsas) a 4° C O/N. El ADN se almacenó a -20° C.

III. JUSTIFICACIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito que presenta variabilidad genética, dividiéndose en tres grandes subgrupos ecológica y biológicamente diferentes: *T. cruzi* I (TCI), *T. cruzi* II (TCII) y *T. cruzi* zimodemo 3 (Z3). En Sur América, TCI y TCII se han asociado a diferentes ciclos de transmisión, siendo TCII el principal grupo asociado a la transmisión en el humano mientras que el TCI se ha asociado tanto a transmisión selvática como doméstica. En México y Centro América se ha reportado que el TCI es el principal grupo asociado tanto a la transmisión doméstica como la selvática. Estudios en ratones y en humanos demuestran que el TCI presenta mayor resistencia a fármacos que el TCII y que infecciones mezcladas de ambos grupos generan diferentes perfiles de resistencia. Por ello, se ha sugerido que se debe tomar en cuenta la diversidad genética de los parásitos en la implementación de la quimioterapia a nivel regional.

Existen dos hipótesis sobre la evolución del TCI y TCII. Una sugiere que el TCII se originó en placentales en Norte América y el TCI en marsupiales en Sur América y que, durante el gran intercambio de fauna ambos se distribuyeron a lo largo del continente. La otra sugiere que ambos se originaron en Sur América, el TCI en marsupiales arborícolas y el TCII en edentados cavernícolas, seguido de la migración de ambos hacia el norte después de la unión de los continentes. En ambos casos, se esperaría que ambos linajes se encuentren en la región del istmo.

Debido a que el linaje de *T. cruzi* puede tener efectos en la respuesta quimioterapéutica, es importante determinar la prevalencia de ambos linajes en los ciclos domésticos. En Guatemala, el *T. cruzi* es transmitido principalmente por los vectores *Rhodnius prolixus*, asociado con techos de palma y bajareque, y *Triatoma dimidiata*, asociado con casas de adobe y cavernas en ambientes silvestres. Debido a la diferente ecología de estos vectores, se propone que ambos demuestren diferencias en la tasa de infección con ambos linajes.

El presente estudio propone caracterizar la tasa de infección con TCI y TCII en *T. dimidiata* y *R. prolixus* colectados en ambientes domésticos en Guatemala. Para este análisis, se propone desarrollar una técnica molecular para la detección de TCI y TCII directamente en muestras de heces derivadas de vectores recolectados durante encuestas

entomológicas previas al control por insecticidas. Se adaptará la técnica que se ha utilizado en otros estudios en la región para la amplificación de la región intergénica del gen del Mini-Exón de tal forma que se puedan detectar mezclas de TCI y TCII.

IV. HIPÓTESIS

- Existe diferencia entre el linaje de *Trypanosoma cruzi* aislado de heces de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en condiciones simpátricas.

Ho: Los linajes de *Trypanosoma cruzi* encontrados en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son iguales.

Ha: Los linajes de *Trypanosoma cruzi* encontrados en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* no son iguales.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL:

Determinar si existe diferencia en los linajes de *Trypanosoma cruzi* encontrados en los vectores *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* simpátricos, mediante la caracterización genética del parásito utilizando la región intergénica del gen del mini-exón.

B. ESPECÍFICOS:

- Optimizar el PCR múltiplex anidado que amplifica la región intergénica del gen del mini-exón en cultivos de *T. cruzi* derivados de homogenizados intestinales de triatominos.
- Amplificar la región intergénica del mini-exón de ADN de *T. cruzi* de muestras de heces y cultivos por medio de la reacción externa de un PCR anidado, utilizando los cebadores kMe1F y kMe2R.
- Determinar si las muestras de ADN de *T. cruzi* en heces y cultivos presentan amplificación para *T. cruzi* I o *T. cruzi* zimodemo 3 utilizando los cebadores TC1F, TC3F y MER por medio de la reacción interna de un PCR múltiplex anidado.
- Determinar si las muestras de ADN de *T. cruzi* de heces y cultivos presentan amplificación para *T. cruzi* II utilizando los cebadores TC2F y MER por medio de la reacción interna de un PCR anidado.
- Determinar si las muestras de ADN de heces y cultivos presentan amplificación para *T. rangeli* utilizando los cebadores TRF y MER por medio de la reacción interna de un PCR anidado.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Muestras de ADN

Las muestras de ADN utilizadas fueron previamente extraídas de heces preservadas en seco y en urea, las cuales provenían de los triatominos *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* recolectados en ambientes domiciliarios en los departamentos de Jalapa, Zacapa y Chiquimula. Así también muestras de ADN previamente extraídas de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata* provenientes de Jalapa, Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa y Chiquimula. (ver Apéndice: Muestras de heces utilizadas para ésta tesis y resultado obtenido). El análisis mediante PCR de muestras de heces se realizó con ADN sin dilución, mientras que el de cultivos se realizó en dilución 1:100.

B. Controles:

Se utilizaron los controles positivos para *T. cruzi* previamente extraídos: ADN de spike de heces con *T. cruzi* cepa H7 (proveniente de Guatemala), cepa Tehuentepec (proveniente de México) para *T. cruzi* I, cepa Tulahuen (proveniente de Chile) para *T. cruzi* II, cepa Can III (proveniente de Brazil) para *T. cruzi* Zimodemo 3; todos ellos se utilizaron en dilución 1: 100. Además se tuvo un control para determinar la presencia de *T. rangeli* el cual se utilizó sin dilución. Como control negativo se utilizó agua.

C. Extracción de ADN de Control para *T. rangeli*

Se utilizó el Kit Isoquick “Nucleic Acid Extraction”(ORCA, USA). Se agregó 0.5ml del *T. rangeli* en DMSO en dos tubos; se centrifugaron a 12,000 rpm x 15 min. El precipitado se resuspendió con 500 µl de Reactivo A (Sample Buffer). Se incubó por 15 min. a temperatura ambiente. Las células se lisaron con 500µl de reactivo 1 (solución de lisis). Las dos alícuotas se guardaron a -20° C por 1 día. Se realizaron 9 alícuotas de 200µl de las células en solución de lisis.

A cada alícuota se le agregó 500µl de reactivo 3 (buffer de extracción). Se incubó a 65° C en baño de agua durante 10 min. Se agitó con vortex y se centrifugó a 12,000rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos. Y se le agregó

500µl de reactivo 2(buffer de extracción). Se agitó con vortex 10 seg. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. La nueva fase acuosa se transfirió a nuevos tubos. Se estimó el volumen de la fase acuosa y se le agregó 0.1 volumen de reactivo 4(acetato de sodio). Se agregó un volumen igual de isopropanol a la fase acuosa. Se mezcló suavemente. Se centrifugó a 12,000rpm x 5 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar en desadora por 3 horas. El precipitado se disolvió en 25µl de reactivo 5 (agua libre de ARNasas) y se almacenó a -20° C.

D. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de la región intergénica del gen del miniexón(NTS-ME):

La región del gen del mini-exón se amplificó realizando un PCR anidado múltiplex:

1. Optimización. Se realizó una optimización de las reacciones externa e interna del PCR anidado, utilizando muestras de cultivos de tracto digestivo de triatominos y controles positivos.

a. Reacción externa. Se hicieron variaciones en las condiciones de la mezcla de reacción: concentración de dNTP's y ADN.

b. Reacción interna múltiplex. Se hicieron variaciones en las condiciones de la mezcla de reacción: cambio del cebador antisentido, concentración y temperatura de hibridación de los cebadores.

2. Análisis de muestras. Se analizaron las muestras de ADN con las con las condiciones de PCR optimizadas (ver apéndice Condiciones de PCR optimizadas para análisis de muestras). Los productos de amplificación se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% (24:1) y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio. En cada pozo del gel se cargó 5µl de ADN mezclado con 1µl buffer de carga.

E. Análisis estadístico

Se realizó una prueba exacta de Fisher (Fisher exact's test) comparando los linajes de *T. cruzi* encontrados en las heces de los vectores *R. prolixus* y *T. dimidiata* y otra comparando los linajes de *T. cruzi* encontrados en cultivos y heces de *T. dimidiata*. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con $p < 0.05$. La prueba se llevó a cabo utilizando el programa de la página web: <http://langsrund.com/fisher.htm>, el cual utiliza la siguiente fórmula para el cálculo del valor p .

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Se hizo un análisis de valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) utilizando el programa estadístico SAS 6.0. Se consideró como estadísticamente significativa con $p < 0.05$.

El ordenamiento de filas (Test) y columnas (Response) es muy importante en el análisis estadístico utilizando el programa SAS. El VPP se define como la proporción de pruebas positivas (Test =1) que tienen una respuesta verdaderamente positiva (Response=1), esto es la celda 1, 1 / total de la fila. El VPN se define como la proporción de pruebas negativas (Test =0) que tienen una respuesta verdaderamente negativa (Response=0), esto es la celda 2, 2 / total de la fila.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de la región intergénica del gen del miniexón (NTS-ME):

1. Optimización. Se realizó la optimización del protocolo molecular de PCR anidado (Reacción externa y reacción interna) para la amplificación de la región intergénica del gen del mini exón (NTS-ME). Para esta optimización, fueron utilizados los controles positivos: H7, Tehuntepec, Can III, Tulahuen y *T. rangeli*, junto con 3 muestras de ADN extraído de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata*. La cepa H7 fue aislada en Guatemala de humano, la cepa Tehuntepec en México de *Triatominae*, la cepa Can III en Brazil de humano y la cepa Tulahuen fue aislada en Chile de humano.

Se partió de un protocolo base (Cuadro 5) desarrollado en el Laboratorio de Chagas del Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala (datos no publicados).

El protocolo previamente desarrollado para la reacción externa presentaba un problema de especificidad, ya que los resultados de la amplificación mostraban una serie de bandas de ADN inespecíficos, con diversos tamaños; así también que no se observaban los productos de amplificación deseados de los diversos controles positivos.

Para la reacción externa se utilizaron los cebadores kMe1F (5'-TTCTGTACT ATATTGGTA-3') y kMe2R (5'-CAATATAGTACAGAACTG-3') los cuales fueron desarrollados en el Laboratorio de Chagas del Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle, basándose en los cebadores 1 (5'-gggaagcTTCTGTACTATATTGGTA-3') y 2 (5'-gggaattCAATATAGTACAGAACTG-3') desarrollados por Murthy, Dibbern y Campbell en 1992, los cuales contienen una secuencia de 22 nucleótidos que permiten amplificar unidades repetitivas (y repeticiones múltiples) del gen del mini exón.

En el cuadro 4 se pueden observar las condiciones para la formación de homodímeros y heterodímeros de los cebadores kMe1F y kMe2R. Para la formación de homodímeros se observa que el ΔG se encuentra dentro del rango aceptable pero se llegan a formar enlaces hasta de 4 bases (datos no mostrados), lo cual hace que los cebadores no sean tan adecuados para su uso. En cuanto a la formación de

heterodímeros el ΔG de -21.09 kcal/mol lleva a una formación de 15 enlaces entre las bases de los cebadores (datos no mostrados), esto hace que los cebadores no sean muy adecuados para su uso. A pesar de lo anterior descrito los cebadores fueron utilizados ya que si permitían la amplificación del producto deseado.

Cuadro 4. Condiciones de cebadores del PCR externo

| Cebador | Tm (°C) | Homodímeros | Heterodímeros |
|---------|------------|------------------------|------------------------|
| | | Rango ΔG | Rango ΔG |
| kMe1F | 46 | -3.91 - -0.96 kcal/mol | -21.08 - -0.96kcal/mol |
| kMe2R | 50 | -3.91 - -0.96 kcal/mol | |

Se realizaron diversos cambios en la reacción externa; se disminuyó la concentración de ADN, debido a que una alta concentración de ADN puede llevar a un aumento en la unión de los cebadores con otras moléculas de ADN, produciendo así productos inespecíficos. También se llevó a cabo un cambio en la temperatura de hibridación de los cebadores, ya que los productos inespecíficos se podían deber a que la temperatura de hibridación de los cebadores era muy baja. En el cuadro 5 se presenta el protocolo final para la reacción externa.

Cuadro 5. Protocolo base y final para PCR externo

| Reactivo | Base | Final |
|-------------------------|--------------------------|---|
| | Concentración final | Concentración final |
| Buffer de amonio(CLP) | 1x | 1x |
| MgCl ₂ (CLP) | 1.5mM | 1.5mM |
| dNTP's | 0.15mM | 0.15mM |
| kMe1F | 0.20 μ M | 0.20 μ M |
| kMe2R | 0.20 μ M | 0.20 μ M |
| Taq polimerasa (CLP) | 0.04U/ μ L | 0.04U/ μ L |
| ADN | 1 μ L(dilución 1:10) | 1μL(dilución 1:100) |
| 30 ciclos | Desnaturalización | 94° C x 5 min |
| | Desnaturalización | 94° C x 30 s. |
| | Hibridación | 45° C x 30 s |
| | Extensión | 72° C x 30s |
| | Extensión final | 72° C x 10 min. |
| | | 94° C x 5 min |
| | | 94° C x 30 s. |
| | | 48° C x 30s |
| | | 72° C x 30s |
| | | 72° C x 10 min. |

Se desarrolló la reacción interna múltiplex utilizando 1µl del producto de amplificación externo realizado bajo las condiciones descritas anteriormente; se partió del protocolo base desarrollado en el Laboratorio de Chagas del Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala (Cuadro 6). Para la reacción interna múltiplex se utilizaron los cebadores desarrollados por Fernández, *et. al.* 2001.

.Cuadro 6. Protocolo base y final para PCR interno múltiplex

| Reactivo | Base | Final |
|-------------------------|---------------------|---------------------|
| | Concentración final | Concentración final |
| Buffer de amonio (CLP) | 1x | 1x |
| MgCl ₂ (CLP) | 1.5mM | 1.5mM |
| dNTP's | 0.15mM | 0.15mM |
| TC1F | 0.25µM | 0.15µM |
| TC2F | 0.25µM | 0.15µM |
| TC3F | 0.25µM | 0.15µM |
| TRF | 0.25µM | 0.15µM |
| kMe2R / MER | 0.25µM | 0.15µM |
| Taq polimerasa (CLP) | 0.04U/µL | 0.04U/µL |
| ADN | 1µL | 1µL |
| Desnaturalización | 94° C x 5 min | 94° C x 5 min |
| 30 ciclos { | Desnaturalización | 94° C x 30 s. |
| | Hibridación | 55° C x 30s |
| | Extensión | 72° C x 30s |
| | Extensión final | 72° C x 10 min. |

Se observó que bajo las condiciones base del PCR interno múltiplex hubieron productos inespecíficos y no se observó el producto de amplificación deseado para cada control positivo de *T. cruzi*, así también que no se observaba amplificación para el control *T. rangeli*. Dicho protocolo base se trataba de un PCR semi anidado, debido a que en la reacción interna se utilizaba el mismo cebador antisentido (kMe2R) utilizado en la reacción externa. Se cambió el cebador kMe2R por el cebador MER desarrollado por Fernández, 2001. Por lo anterior se realizó un cambio en la temperatura de hibridación de los cebadores. Fernández *et. al.* utilizaron 50° C para la hibridación de todos los cebadores en el PCR múltiplex, por lo que probó dicha temperatura y las temperaturas 55° C y 63° C. Se determinó que la mejor temperatura fue 55° C a pesar de la gran diferencia de temperatura con los cebadores TC1, TC2, TC3 y TR F (Cuadro 7) permitió

así la hibridación de todos los cebadores con el templado de ADN y haciendo específica la amplificación. Debido a que el control de *T. rangeli* presentaba una banda pálida se decidió hacer un disminución en la concentración de los cebadores, de 0.25 μ M a 0.15 μ M. Con dichos cambios se observó que todas las bandas de los controles positivos son del tamaño deseado (Figura 16).

Cuadro 7. Cebadores y sus respectivos Tm

| Cebador | Tm |
|---------|-------|
| TC1F | 68° C |
| TC2 F | 70° C |
| TC3 F | 72° C |
| TR F | 66° C |
| ME R | 58° C |

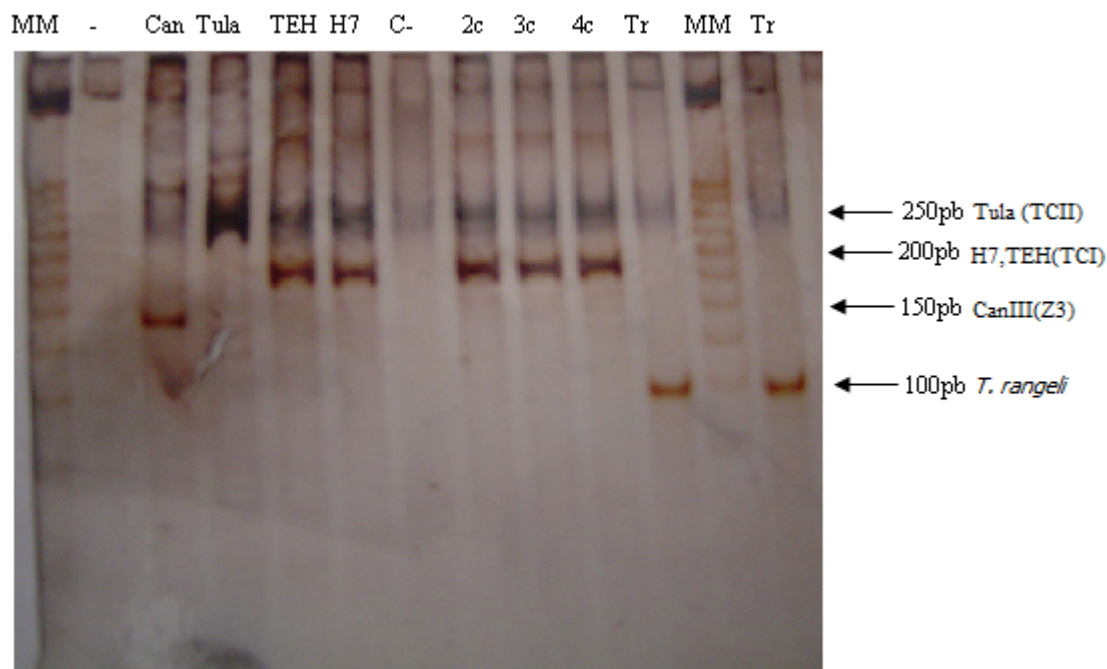


Figura 16. Optimización PCR del NTS-ME visualizado en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con plata. Pozo MM) marcador molecular 25bp (Promega, Madison, WI); C-) control negativo; 3c, 2c y 4c) muestras provenientes de cultivo de tracto digestivo de *T. dimidiata*; H7) cepa H7 control positivo para *T. cruzi* I; TEH) cepa Tehuentepec control positivo para *T. cruzi* I; Can) cepa Can III control positivo *T. cruzi* Z3; Tula) cepa Tulahuén control positivo para *T. cruzi* II; Tr) control positivo para *T. rangeli*; -) pozo vacío.

Debido a que los controles positivos para *T. cruzi* I (200pb) presentaban también una banda del mismo tamaño a la del control positivo Tulahuen para *T. cruzi* II (250pb) se decidió separar la detección de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II por medio de dos PCR internos para evitar así falsos positivos (ver apéndice: condiciones de PCR optimizadas para análisis de muestras). Esta banda no se ha observado en ningún otro estudio en donde se utiliza el PCR múltiplex del mini-exón, por lo que inicialmente se pensó que podía deberse a proteínas, pero mediante tinción con bromuro de etidio se determinó que dicha banda no era causada por proteínas. Dicha banda se pudo deber a que los controles positivos para *T. cruzi* I: H7 y TEH se encontraban contaminados con *T. cruzi* II o que son mezclas ó híbridos, y a que las muestras 2c, 3c y 4c efectivamente se encontraban infectados también con *T. cruzi* II. A continuación se presentan los resultados obtenidos (Figuras 17 y 18) utilizando los PCR internos separados:

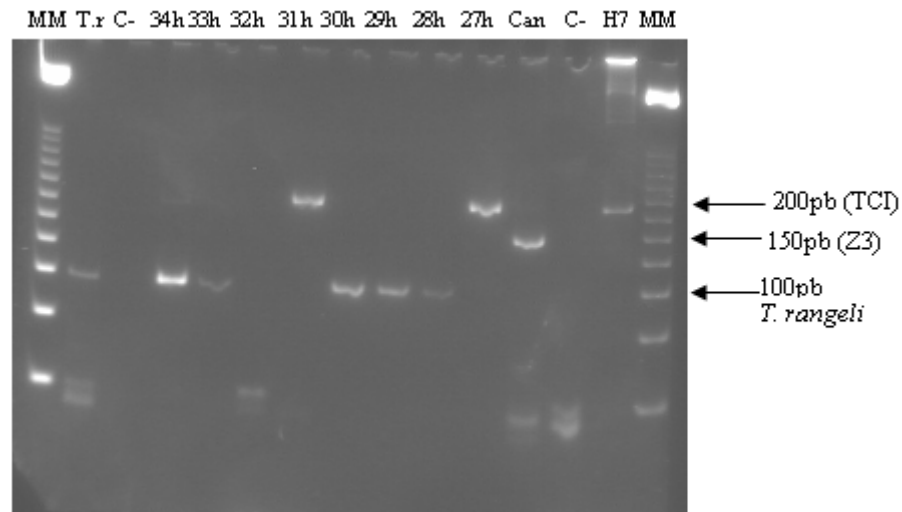


Figura 17. Amplificación con PCR múltiplex del NTS-ME de muestras de heces secas visualizadas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio Pozo MM) marcador molecular 25bp (Promega, Madison, WI); C-) control negativo; 27-34h) muestras; H7) cepa H7 control positivo para *T. cruzi* I; Can) cepa Can III control positivo *T. cruzi* Z3; Tr) control positivo para *T. rangeli*

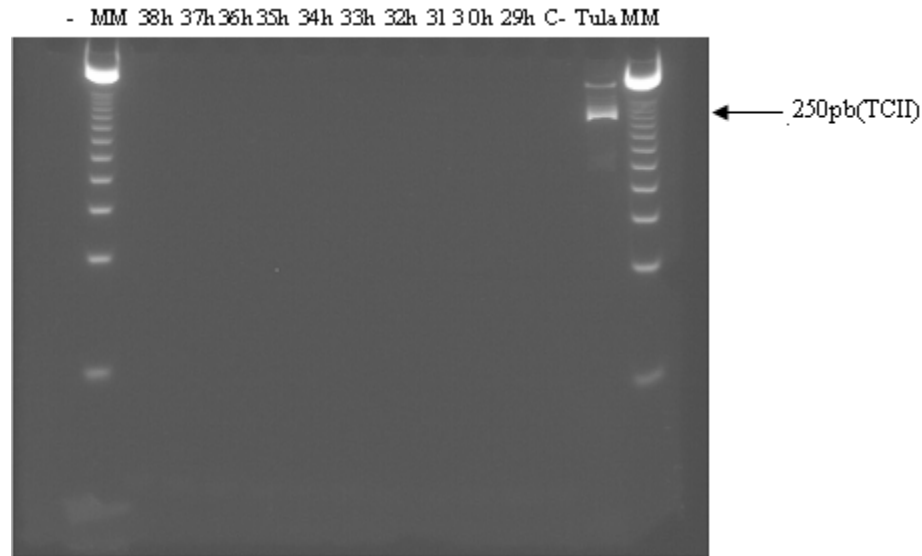


Figura 18: Amplificación con PCR para *T. cruzi* II del NTS-ME de muestras de heces secas visualizadas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio. Pozo MM, marcador molecular 25bp (Promega, Madison, WI); C-) control negativo; 29-38h) muestras; Tula) cepa Tulahuen control positivo para *T. cruzi* II; -) pozo vacío.

2. Análisis de muestras. Utilizando el gen del mini-exón, en Guatemala y México se ha encontrado TCI tanto en vectores como en hemocultivos de muestras humanas (ciclo doméstico y selvático), y se cree que juega un papel importante en infecciones humanas (Ruíz-Sánchez, *et. al.* 2005; Higo, *et. al.* 1997, Higo, *et. al.* 2000), así también en Panamá el TCI se ha encontrado en hemocultivos de muestras humanas y en el vector *R. pallescens*, siendo éste el principal genotipo en el ciclo doméstico/peridoméstico y selvático y el responsable de la enfermedad en éste país (Sousa, *et. al.* 2006, Samudio, *et. al.* 2007). Mientras que en Brazil TCII es preferencialmente asociado con infecciones humanas y TCI es asociado principalmente con el ciclo selvático, así como el ciclo doméstico (Fernandes, *et. al.* 1998,1998a, 1999, 2001, Miles, *et. al.* 1977, O'Connor, *et. al.* 2007).

Existen varias hipótesis que explican que la evolución de de los linajes de *T. cruzi* se encuentra relacionado con la evolución sus hospederos. Una de las hipótesis sugiere que el TCII evolucionó en América del Sur junto con los placentales, mientras que el TCI evolucionó en América del Norte junto con marsupiales y edentados, cuando ambos continentes se encontraban separados. Se propone que no importando el origen de los

linajes, el gran intercambio de fauna durante la conexión de las Américas a través del istmo de Panamá debió permitir el movimiento del TCII y el TCI en Centro América.

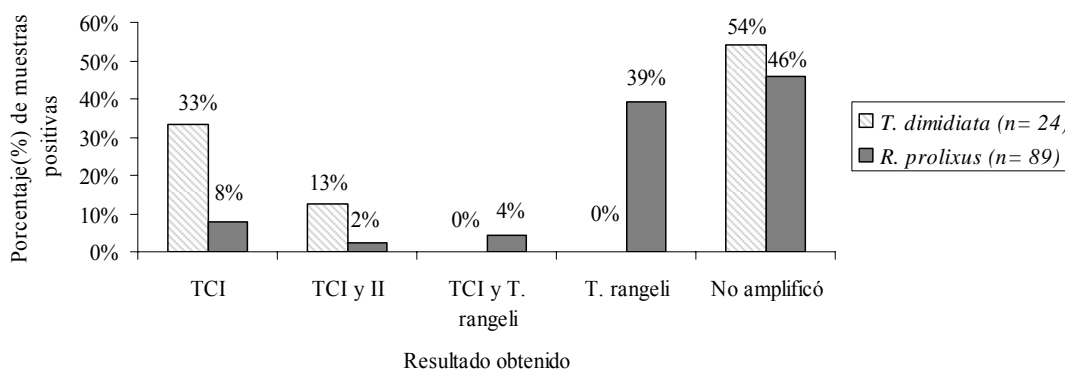
En las muestras analizadas, recolectadas en ambientes domésticos se encontró que un 13%(3/24) de muestras provenientes de *T. dimidiata* y un 2%(2/89) de *R. prolixus* se encontraban infectadas con ambos linajes, TCI y TCII; mientras que un 33%(8/24) de *T. dimidiata* y 8%(7/89) de *R. prolixus* se encontraban infectados sólo con TCI. Un 39%(35/89) de las muestras de *R. prolixus* se encontraban infectadas únicamente con *T. rangeli*, mientras que un 4%(4/89) se encontraban infectadas simultáneamente con TCI y *T. rangeli* (Cuadro 8, Figura 19). No se encontró el TCII sólo en ninguno de los vectores.

Cuadro 8. Resultados obtenidos para muestras de heces de triatominos

| Resultado | <i>T. dimidiata</i> [†] | % | <i>R. prolixus</i> [†] | % |
|-------------------------|----------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
| TCI | 8 | 33 | 7 | 8 |
| TCII | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TCI y II | 3 | 13 | 2 | 2 |
| TCI y <i>T. rangeli</i> | 0 | 0 | 4 | 4 |
| <i>T. rangeli</i> | 0 | 0 | 35 | 39 |
| No amplificó | 13 | 54 | 41 | 46 |
| Total | 24 | 100 | 89 | 100 |

[†]Los números indican el numero de muestras positivas para cada linaje de *T. cruzi*: TCI (*T. cruzi* I), TCII (*T. cruzi* II), para *T. rangeli* y muestras que no amplificaron.

Figura 19: Resultados obtenidos (%) para muestras de heces de *R. prolixus* y *T. dimidiata*



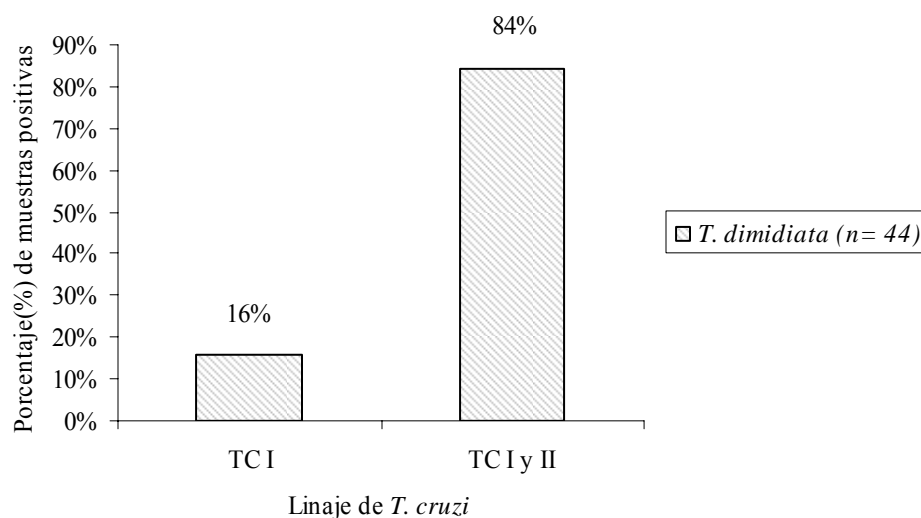
Así también el análisis de muestras de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata* indicó que un 84% (37/44) de las muestras estaban infectadas con ambos linajes; mientras que un 16%(7/44) se encontraban infectadas con TCI (Cuadro 9, Figura 20). Al igual que las muestras provenientes de heces, no se encontró el TCII sólo.

Cuadro 9. Resultados obtenidos para muestras de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata*[†]

| Resultado | <i>T. dimidiata</i> [†] | % |
|-----------|----------------------------------|-----|
| TC I | 7 | 16 |
| TC II | 0 | 0 |
| TC I y II | 37 | 84 |
| Total | 44 | 100 |

[†]Los números indican el numero de muestras positivas para cada linaje de *T. cruzi*: TCI (*T. cruzi* I), TCII (*T. cruzi* II).

Figura 20: Resultados obtenidos (%) para muestras de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata*



Estos resultados señalan la presencia de cepas TCII en el ámbito doméstico en la región. Se observa que en Guatemala no existe una relación únicamente del TCI con el ciclo doméstico de transmisión; sino que también del TCII.

En estudios anteriores realizados por Higo, *et. al.* 1997 y 2000, Ruíz-Sanchez, *et. al.* 2005 se ha encontrado principalmente TCI, no se puede descartar que el TCI sea

seleccionado cuando se inoculan los parásitos en ratón o cuando se cultivan las muestras en medio LIT. Así también, en el estudio de Ruíz-Sánchez se utilizaron únicamente 6 muestras, por lo que dicho estudio no tiene un número de muestras significativo y no se puede descartar la presencia de TCII.

Una adecuada caracterización de *T. cruzi* es esencial para determinar el rol que los diferentes linajes puedan jugar en la patogénesis, manifestaciones clínicas y diferencia en la respuesta a la quimioterapia. Se conoce que *T. cruzi* I son más resistentes a las drogas (benznidazol e itraconazol) que *T. cruzi* II; así también que una mezcla en linajes de *T. cruzi* presenta una respuesta distinta al tratamiento con benznidazol que una infección con un solo linaje. Así también se cree que el TCII es más patogénico, siendo asociado a los mega síndromes; mientras que el TCI es menos patogénico y es asociado a las manifestaciones cardíacas (Botero, *et. al.* 2007).

La presencia de ambos linajes de *T. cruzi* en las heces de los vectores puede generar una epidemiología más completa ya que tanto vectores como hospederos podrían estar infectados con ambos linajes, y en éstos últimos, darse un tropismo diferencial a tejidos ocasionando así manifestaciones clínicas diversas. Por esto es importante conocer el genotipo de *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas en Guatemala ya que el tratamiento(s) adecuado para pacientes depende de dicho genotipo; por lo mismo se propone analizar muestras de humanos (hemocultivos, tejidos) con casos de enfermedad Chagas.

Debido a que bajo el microscopio es difícil distinguir entre *T. cruzi* y *T. rangeli* debido a la morfología muy similar, en este estudio se utilizaron cebadores para detectar la presencia de *T. rangeli* en heces de los triatominos. Se determinó que un 39% (35/89) de las muestras de *R. prolixus* se encontraban infectadas con *T. rangeli*; mientras que un 4%(4/89) se encontraba infectado con TCI y *T. rangeli*. El porcentaje de muestras positivas para *T. rangeli* fue mayor a los valores reportados en un estudio anterior, en donde 12/68 (18%) de las muestras fueron positivas, y en las cuales el 1.5% se encontró *T. rangeli* solo y un 16.7 % junto con *T. cruzi* (Dorn, *et. al.* 1999).

En este estudio no se observó una competencia entre la amplificación para la mezcla de *T. cruzi* y *T. rangeli* ya que las muestras positivas únicamente para *T. rangeli* mediante el PCR múltiplex se volvieron a analizar mediante PCR únicamente con el

cebador para la detección de TCI, confirmándose que la ausencia de TCI no fue debido a la presencia de *T. rangeli*. Como era de esperarse en *T. dimidiata* no se encontró presencia de *T. rangeli*.

La ausencia de amplificación pudo deberse a una muy baja cantidad de ADN del parásito para ser detectada por PCR o que el ADN de las muestras sin amplificación contenían algún compuesto que inhibió el PCR o que degradó el ADN; esto debido a que dichas chinches fueron disectadas en diferentes períodos antes o después de alimentadas, por lo tanto el proceso de digestión pudo haber liberado otros productos del metabolismo. También se pudo deber al proceso de disección de dichas chinches, lo cual pudo causar que las heces tuvieran contacto con otros compuestos inhibidores, como el grupo hemo (Comunicación personal, Pamela Pennington). Para evaluar la inhibición se podrían realizar diluciones de las muestras, ya que en este proceso se diluyen los inhibidores hasta cierto punto donde ya no perjudique la amplificación del PCR. Sin embargo, no se puede descartar infección de tripanosoma en estas muestras fecales que presentaron inhibidores de PCR.

Para determinar si existe diferencia significativa en los linajes de *T. cruzi* entre *T. dimidiata* y *R. prolixus* se realizó una prueba exacta de Fisher.

Cuadro 10. Distribución de TCI y TC I/II en heces de *T. dimidiata* y *R. prolixus*

| Linaje | <i>T. dimidiata</i> | <i>R. prolixus</i> | Total |
|----------|---------------------|--------------------|-------|
| TCI | 8 | 11 | 19 |
| TCI y II | 3 | 2 | 5 |
| Total | 11 | 13 | 24 |

p = 0.629 por método de Fisher exacto

Se determinó que no existe diferencia significativa entre los linajes de *T. cruzi* encontrados en heces de *T. dimidiata* y *R. prolixus*.

En este estudio no se observó la relación descrita por Gaunt & Miles, en el cual proponen que las especies de *Rhodnius* están asociadas con TCI y *Triatoma* con TCII. La presencia de ambos linajes se puede deber al traslape que existe entre el ciclo doméstico y selvático, ya que los vectores selváticos como *T. dimidiata* acarrean el parásito de ecótopos silvestres (cuevas, selvas, madrigueras, palmeras, chultunes,

cúmulos de piedra, troncos secos) a las viviendas humanas atraídos por la luz. Así también con la migración de asentamientos humanos se han invadido zonas silvestres y las viviendas se han construido cercanas a estos ecótopos en los que se encuentran las chinches, las cuales pueden ser atraídas por la luz de las viviendas y llegar a estas (Menes *et. al.* 2007). Los reservorios selváticos como el tacuazín y roedores pueden invadir temporalmente ecótopos peridomésticos y domésticos en búsqueda de alimento o refugio (Cordón-Rosales, Pennington, 2007).

Las muestras se deben analizar mediante otros métodos para descartar que las mezclas de TCI y TCII encontradas sean híbridos, lo cual indicaría que en algún momento hubo eventos de reproducción sexual en *T. cruzi* (Higo, *et. al.* 2000) y que posteriormente estos híbridos se propagaron clonalmente (Freitas, *et. al.* 2006). Esto es de mucha importancia ya que aunque haya un bajo nivel de intercambio genético, esto permitiría la recombinación de cualquier atributo biológico o de marcadores genéticos como la sensibilidad hacia drogas (Higo, *et. al.* 2000).

Utilizando el análisis estadístico de valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se determinó que en las muestras de heces *R. prolixus* la presencia de TCI predice que va a encontrar TCII en un 15.38% de las muestras (IC 95%: 1.92%-45.45%) y que la ausencia de TCI predice la ausencia del TCII en un 100%(IC 95%: 90%-100%) (Cuadro 11). Esto indica que sí hay probabilidad de encontrar mezclas de TCI/TCII en las muestras de heces *R. prolixus* Guatemala y que la probabilidad de encontrar únicamente TCII es muy baja, como se demostró en este estudio, no se encontró TCII sólo.

Así también se determinó que la presencia de *T. rangeli* predice que se va a encontrar *T. cruzi* en un 10.26% de las muestras (IC 2.87%-24.22%) y que la ausencia de *T. rangeli* predice la ausencia de *T. cruzi* en un 100%(IC 66.37%-100%) (Cuadro 11). Debido a que *R. prolixus* puede ser portador de ambos *T. rangeli* y *T. cruzi*, los datos señalan que si hay probabilidad de encontrar ambos parásitos en las heces de dicho vector mediante la técnica de PCR descrita en este estudio.

Cuadro 11. Asociación de TCI con TCII y de *T. rangeli* con *T. cruzi* en muestras de heces de cada individuo de *R. prolixus*

| <i>R. prolixus</i> (n=48) | VPP | | VPN | |
|---|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| | Proporción (IC 95% [†]) | p | Proporción (IC 95% [†]) | p |
| TCI predice TCII | 0.1538 (0.0192-0.4545) | 0.0225 | 1.0000 (0.9000-1.0000) | 5.821x10 ⁻¹¹ |
| <i>T. rangeli</i> predice <i>T. cruzi</i> | 0.1026 (0.0287-0.2422) | 3.353x10 ⁻⁷ | 1.0000 (0.6637-1.0000) | 0.0039 |

[†] Intervalo de Confianza al 95%.

VPP = a/a + b; donde a= total de muestras positivas para ambos TCI y TCII ó *T. rangeli* y *T. cruzi*, b= total de muestras positivas para TCII pero negativas para TCI

VPN = d/c+d; donde d= total de muestras negativas para ambos TCI y TCII ó *T. rangeli* y *T. cruzi*, c= total de muestras positivas para TCII ó *T. cruzi* pero negativas para TCI ó *T. rangeli*

En la muestras de heces de *T. dimidiata* se encontró que la presencia de TCI no es significativo para que esté TCII presente (Cuadro 12). Esta no significancia se debe a que el intervalo de confianza pasa por 0.50, lo cual significa que al azar, no existe una relación entre dichas variables.

Cuadro 12. Asociación de TCI con TCII en muestras de heces de cada individuo de *T. dimidiata*

| <i>T. dimidiata</i> (n= 11) | VPP | | VPN | |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|---|
| | Proporción (IC 95% [†]) | p | Proporción (IC 95% [†]) | p |
| TCI predice TCII | 0.2727 (0.0602-0.6097) | 0.2266* | - | - |

* valores p no significativos, [†] Intervalo de Confianza al 95%.

VPP = a/a + b; donde a= número de muestras positivas para ambos TCI y TCII, b= número de muestras positivas para TCII pero negativas para TCI

VPN = d/c+d; donde d= número de muestras negativas para ambos TCI y TCII, c= número de muestras positivas para TCII pero negativas para TCI

Tomando en cuenta las muestras de heces tanto de *R. prolixus* como *T. dimidiata* se encontró que el TCI predice la presencia de TCII en una 20.83% de las muestras (IC 7.13%-42.15%) y que la ausencia de TCI predice la ausencia de TCII en un 100%(IC 90%-100%). También se determinó que la presencia de TCII no es significativa para que esté TCI, y que la ausencia de TCII predice la ausencia de TCI en 64.81% de las muestra (IC 50.62%-77.32%) (Cuadro 13).

Cuadro 13 Asociación de TCI con TCII en muestras de heces de cada individuo de *R. prolixus* y *T. dimidiata*

| <i>R. prolixus</i> y <i>T. dimidiata</i> (n= 59) | VPP | | VPN | |
|---|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|-------------------------|
| | Proporción (IC 95% [†]) | P | Proporción (IC 95% [†]) | p |
| TCI predice TCII | 0.2083 (0.0713-0.4215) | 0.0066 | 1.0000 (0.9000-1.0000) | 5.821x10 ⁻¹¹ |
| TCII predice TCI | 1.0000 (0.4782-1.0000) | 0.0625* | 0.6481 (0.5062-0.7732) | 0.0402 |

* valores p no significativos, [†] Intervalo de Confianza al 95%.

VPP = a/a + b; donde a= número de muestras positivas para ambos TCI y TCII, b= número de muestras positivas para TCII pero negativas para TCI ó viceversa.

VPN = d/c+d; donde d= número de muestras negativas para ambos TCI y TCI, c= número de muestras positivas para TCII pero negativas para TCI ó viceversa.

Debido a que se tenían los resultados del análisis de los linajes de *T. cruzi* de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata* se realizó una comparación con los linajes encontrados en las heces de dicho vector.

Cuadro 14. Distribución de TCI y TCII en heces y cultivos intestinales de *T. dimidiata*

| Linaje | Heces | Cultivos [†] | Total |
|----------|-------|-----------------------|-------|
| TCI | 8 | 7 | 15 |
| TCI y II | 3 | 37 | 40 |
| Total | 11 | 44 | 55 |

p= 0.0005 por método Fisher exacto, [†] Cultivos intestinales

Por medio de la prueba Fisher exacta se encontró que existe diferencia significativa en la distribución de los linajes de *T. cruzi* encontrados en heces y cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata*, con la mayoría de cultivos presentando una infección mixta. Esto sugiere que el cultivo puede seleccionar cepas mixtas o que las cepas mixtas son menos prevalentes como formas metacíclicas en el recto (Comunicación personal, Pamela Pennington).

Se recomienda realizar una análisis de muestras de heces y de cultivos de tracto digestivo de la misma *T. dimidiata*, para observar si las heces contienen algún compuesto que estén interfiriendo con la detección de ambos linajes; o para determinar si los linajes

encontrados en el intestino se correlaciona con lo que se encuentra en las heces. Se podrían buscar inhibidores del PCR realizando un spike de heces de muestra de cultivos.

En este estudio se determinó que la distribución de los linajes de *T. cruzi* encontrados en heces de *R. prolixus* y *T. dimidiata* son iguales. Y que existe una alta tasa de infección con *T. rangeli* en *R. prolixus* en Guatemala. Así también se confirmó que el intercambio de fauna durante la conexión de las Américas a través del istmo de Panamá permitió el movimiento de TCII y TCI en Centro América.

VIII. CONCLUSIONES

- No se encontró diferencia entre los linajes de *T. cruzi* en heces de *R. prolixus* y *T. dimidiata* ($p=0.6299$)
- No se encontró diferencia entre los linajes de *T. cruzi* en heces y cultivos de *T. dimidiata* ($p=0.0005$), con la mayoría de cultivos presentando una infección mixta.
- El istmo de Panamá provee un ambiente que permitió la interacción entre hospederos que llevaban ambos linajes (TCI y TCII) durante el intercambio de fauna, llevando así a infecciones mixtas y/o a la formación de híbridos en especies de triatominos.
- En Guatemala el TCI y TCII están relacionados con el ciclo doméstico tanto en *R. prolixus* como en *T. dimidiata*.
- Las muestras de *R. prolixus* (43%) están principalmente infectadas con *T. rangeli*.

IX. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de muestras de *T. dimidiata* para incrementar la significancia estadística.
- Realizar análisis de microsatélites para verificar si la presencia TCI y TCII mediante análisis de mini-exón se debe a cepas híbridas o mezclas de cepas TCI y TCII.
- Realizar la caracterización genética de los linajes de *T. cruzi* utilizando muestras clonadas.
- Realizar el mismo estudio con muestras provenientes de casos humanos y vectores/reservorios del ciclo selvático de transmisión.
- Utilizar un control interno para la amplificación.

X. LITERATURA CITADA

- Agudelo, A. 2006. *Experiencias epidemiológicas del grupo Chagas de la Universidad de Antioquia. En memorias VIII Curso Internacional Eco-epidemiología de la enfermedad de Chagas y métodos para su estudio.* Editores, Jaramillo, N; Parra, G; Triana, O. pp: 113-123
- Andrade, SG. 1999. *Trypanosoma cruzi clonal structure parasite strain and the importance of principal clones.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1): 185-187.
- Anez N, Crisante G, da Silva, FM., Rojas A, Carrasco H., Umezawa ES, Stolf AM, Ramírez JL, Teixeira, MM. 2004. *Predominance of lineage I among Trypanosoma cruzi isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease.* *Trop. Med. Int. Health.* 9: 1319-1326
- Angulo, V. 2006. *Ensayo de estrategias de control y vigilancia de T. dimidiata.* En VI reunión de la IAPCEF. Editor Felipe Guhl. Colombia. pp: 91-102
- Ashall, F. 1993. *Isolation of RNA and DNA from Trypanosoma cruzi.* In protocols in Molecular Parasitology(vol. 21) by (J.E. Hyde, ed) United Kingdom. Humana Press 119-120.
- Azambuja P y García ES. 2005. *Trypanosoma rangeli interactions within the vector Rhodnius prolixus-A mini review.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100(5): 567-572.
- Borges E, Pires H, Barbosa S, Nunes C, Pereira M, Romanhia A y Diotaiouti D. 1999. *Genetic variability in Brazilian triatominaes and the risk of domiciliation.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1): 371-373
- Botero LA, Mejía AM, Triana O. 2007. *Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de T. cruzi de Colombia.* *Biomédica.* 27(1): 64-74
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS y Zingales B. 1999. *The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the*

- interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Mol Biochem Parasitol. 104(2):219-32.*
- Buscaglia CA.y Di Noia JM. 2003. *Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chaga´s disease. Microbes and Infection. 5: 419-427.*
 - Caceres AG. 2005. *Manual de procedimientos de identificación de Triatomíneos (Hemiptera:Reduviidae) del Perú.* Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud
 - Carcavallo RU, Giron IG, Jurberg J, Lent H. 1998. *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas.* Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
 - Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva Pereira AA, 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.*
 - Carrasco HJ., Frame IA, Valente SA y Miles MA. 1996. *Genetic Exchange as a posible source of genomic diversity in sylvatic populations of Typanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54: 418-424*
 - CDC, 2007. *Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*
http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht_chagas_disease_Spanish.htm
 - Clark CG y Pung OJ. 1994. *Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic Trypanosoma cruzi form North América. Mol. Biochem. Parasitol. 66: 175-179.*
 - Córdón-Rosales C. 2004. *Eco-epidemiology of Chagas disease in Guatemala. Local assessment and knowledge gap.* UVG/CDC.
 - Córdón–Rosales C y Pennigton PM. 2007. *Eco-epidemiología de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Revista de la Universidad del Valle de Guatemala. 16:63-84.*
 - Coronado X, Zulantay I, Rozas M, Apt W, Sánchez G, Rodríguez J. Ortiz S y Solari, A. 2006. *Dissimilar distribution of Trypanosoma cruzi clones in humans after*

- chemotherapy with allopurinol and itraconazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 58(1):216-219
- Cupolillo E, Grimaldi Jr, Momen G, Deverley S. 1995. *Intergenic region typing (IRT) a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania.* *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 145-155.
 - de Souza W. 1999. *A Short Review on the Morphology of Trypanosoma cruzi: form 1909 to 1999.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94(1): 17-36
 - D'Alessandro A, Hincapie O 1986. *Rhodnius neivai: a new experimental vector of Trypanosoma rangeli.* *Am J Trop Med Hyg* 35:512-514.
 - Devera R, Fernandez O, Coura JR. 2003. *Should Trypanosoma cruzi be Called "cruzi" Complex? A review of the Parasite Diversity and the Potencial of Selecting Population afer in Vitro Culturing and Mice Infection.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(1): 1-12.
 - Diotauti, L. 2006. *Métodos de Processamento de Triatomíneos e da informacao associada para determinar os fatores de risco de transmissao do Trypanosoma cruzi as comunidades humanas.* En memorias VIII Curso Internacional Eco-epidemiología de la Enfermedad de Chagas y métodos para su estudio.
 - Dorn, PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, Flores J y Monroy C. 1999. *Utility of the polymerase chain reaction in detection of Trypanosoma cruzi in Guatemalan Chagas disease vectors.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(5): 740-745.
 - Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D y Monroy CM. 2003. *The Chagas Vector, Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae), in Panmitic within and Among Adjacent Villages in Guatemala.* *J. Med. Entomol.* 40(4):436-440
 - Fernades O, Sturn N, Derré R, Campbell DA. 1998. *The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of Trypanosoma cruzi.* *Mol. Biochem. Parasitol* 95: 129-133.

- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Borges J, Carrara N, Junqueira A, Naiff R, Barret T, Degra W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. 1998a. *Brazilian Isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exón and ribosomal RNA sequences. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(6): 807–811
- Fernandes, O. Santos, SS., Junqueria ACV, Jansen, AM, Cupoillo, E, Campbel, DA, Zingales, B y Coura, JR. 1999. *Populational Heterogeneity of Brazilian Trypanosoma cruzi Isolates Revealed by the Mini-exon and Ribosomal Spacers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1): 195-197.
- Fernandes O, Santos SS, Cupoillo E, Mendonga B, Derre R, Junqueira CV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RI, Barret TV, Campbell DA, Coura, J.R. 2001. *A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of Trypanosoma cruzi and T. rangeli in the Brazilian Amazon. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 95: 97-99.
- Fonseca SM, Romanha AJ. 1999. *Characterization of Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1): 177-180.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodríguez L, Gongalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM., Machado CR, Pena SD. 2006. *Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of Trypanosoma cruzi. Plos. phatogens.* 2(3): 0226-0235.
- Gaunt M, Miles M, 2000. *The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(4): 557-565.
- Guhl F y Vallejo G. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920-An Updated Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(4): 435-442.
- Higo H, Yanagi T, Matta V, Agastsuma T, Kanbara H, Tada T, de León MP, Monroy C y Tabarú Y. 1997. *Genetic Structure of Trypanosoma cruzi in Central America and its Comparison with South American Strains. International Journal for Parasitology* 27(11): 1369-1374.

- Higo H, Yanagi T, Matta V, Agatsuma T, Cruz-Reyes A, Uyema N, Monroy C, Kanbara H y Tada I. 2000. *Genetic Structure of Trypanosoma cruzi in American continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America. Parasitology.* 121: 403-408.
- Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, Yanagi T, Cruz-Reyes A, Uyema N, de Arias AR., Matta V, Akahame H, Hirayama K, Takcuchi T, Tada ., Himeno K. 2004. *Genotypic variation among lineages of Trypanosoma cruzi and geographic aspects. Parasitology International.* 53:337-344.
- Kawashita SY, Sanson GFO, Fernández O, Zingales B and Briones MRC. 2001 *Maximun-Likelihood Divergence Date Estimates Based on rRNA Gene Sequences Suggest Two Scenarios of Trypanosoma cruzi Intraspecific Evolution. Mol. Biol. Evol.* 18(12): 2250-2259.
- 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.
- Macedo AM, Martins SM, Chiari E, Pena SD. 1992. *DNA fingerprinting of Trypanosoma cruzi: a new tool for characterization of strains and clones. Mol. Biochem Parasitol.* 55: 147-154
- Macedo AM, Pena SD. 1998. *Genetic variability of Trypanosoma cruzi implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol. Today.* 14: 119-123.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. 2004. *Trypanosoma cruzi: Genetic Structure of Populations and Relevante of Genetic Variability to the Patogénesis of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(1): 1-12
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin J, Schofield CJ y 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.

- Marroquín LA, Mizuno K. 2003. *Control antivectorial de Chagas en Guatemala, estado actual (marzo 2003). Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS): 104-108*
- Martins HR, Moreira Silva R, Valadares HM, Toledo O, Veloso VM, Vitelli-Avelar DM, Carneiro CM, Machado-Coelho LL, Bahia MT, Martins-Filho OA, Macedo AM y Lana M. 2007. *Impact of Dual Infections on Chemotherapeutic Efficacy in Balb/c Mice Infected with Major Genotypes of Trypanosoma Cruzi. Antimicrobial Agents and Chemotherpay. 51(9): 3282-3289*
- Mejía AJ, Paláu MT, Zuñiga CA. 2004. *Trypanosoma rangeli: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. Med. UNAB. 7(21): 166-171*
- Menes M, Monroy C, Rodas A, García M. 2007. *Determinación de hábitats y variabilidad fenotípica de poblaciones silvestres de Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae), asociadas a comunidades rurales en la región norte de Guatemala. USAC. Programa Universitario de Investigación en Ciencia Básica –PUICB-*
- Miles MA, Tøye 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(3):217-25*
- Miles MA, Souza, A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R. and. Tøye PJ. 1978. *Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. 272:819–821*
- Miles MA. 1979. *Transmission cycles and the heterogeneity of Trypanosoma cruzi in Amazonian forest. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), Biology of the Kinetoplastida. Academic Press. New York. 2:117-196.*
- Miles MA, y Cibulskis R.E. 1986. *Zymodeme Characterization of Trypanosoma cruzi. Parasitol. Today. 4:94-97.*
- Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas A. 2003. *American tripanosomiasis (Chaga's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. BMJ. 326: 1444-1448.*

- Monroy C. 1992. *Vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala*. En K Ogata (editor), Informe Anual No. 1(GJET-1) del Proyecto de Cooperación Guatemala Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales. JICA, Guatemala, 128 pp.
- Monroy C, Koga M 1997. *Trypanosoma rangeli: SEM profiles during the migration from the mid gut to the salivary glands of a reduviida bug Rhodnius prolixus via dorsal vessel*. *Jnp J Trop Med Hyg* 25: 191-195.
- Monroy C, Bustamante DM, Rodas A, Rosales R., Mejía M, Tabaru Y. 2003. *Geographic Distribution and Morphometric Differentiation of Triatoma nitida Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98(1): 37-43.
- Monroy C, Rodas A, Mejía M, Rosales R, Tabaru Y. . 2003a. *Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: Infection Rate of Triatoma dimidiata, Triatoma nítida and Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae) with Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)*. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*,. 98(3): 305-310
- Monroy C. 2003b. *Ecology and Control of Triatomine (Hemiptera: Reduveidae) Vectors of Chagas disease in Guatemala, Central America*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehens Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Tecnology 895. 22pp
- Murthy V, Dibbern KM, Campbell DA. 1992. *PCR amplification of mini-exon genes differentiates Trypanosoma cruzi from Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Cellular Probes*. 6: 237-243.
- O'Connor O, Bosseno M, Barnabé C, Douzery EJ, Breniere SF. 2007. *Genetic clustering of Trypanosoma cruzi I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing*. *Infection, Genetics and Evolution* 7:587-593.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. 1998. *Probing genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites*. *Proc. Natl. Acad. Scie USA* 95: 3776-3780.

- Oliveira RP, Melo AIR, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ 1999. *The population structure of Trypanosoma cruzi: expanded analyses of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(1): 65-70.
- OPS/OMS/ MSPAS. 2003. *Informe final: Reunión Internacional para el Establecimiento de Criterios de certificación de la Eliminación de Rhodnius prolixus.* Guatemala 1-52 pp
- Paláu M.T, Montilla M, Zúñiga CA. 2001. *Estudio del comportamiento de dos cepas de Trypanosoma rangeli. Med. UNAB.* 4(12): 161-167
- Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Ordoñez RE, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy MC, Bargues MD, Mas-Coma S, O'connor JE, Angulo VM, Jaramillo N, Cordon-Rosales C, Gomez D and Perez R. 2006. *Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of Triatoma dimidiata with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. Tropical Medicine and International Health.* 11(7): 1092-1103
- Ponce C y Ponce E. Sin año. *Aspectos epidemiológicos de Rhodnius prolixus. Laboratorio Central de Referencia para Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis* Secretaría de Salud, Honduras
- Rivera E. 2003. *Identificación y caracterización de microsatélites polimórficos en Trypanosoma cruzi. Tesis UVG.*
- Rodríguez EM, et. al. 2004. *Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos.* Venezuela. Instituto de Biomedicina.
- Ruiz-Sánchez R, de León MP, Matta V, Reyes PA, López R, Jay D, Monteón VM. 2005. *Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(3): 281-283
- Samudio F, Ortega-Barría E, Saldaña A y Calzada J. 2007. *Predominance of Trypanosoma cruzi I among Panamanian sylvatic isolates. Acta Tropica.* (101): 178-181.

- Schofield CJ. 1994. *Triatominae. (Biología y Control)*. Trad. S. Tims y C.J. Schofield. Eurocommunica Publications. Reino Unido. 80 pp
- Schofield CJ. 2000. *Challenges of Chagas Disease Vector Control in Central America*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2000.1. 36 pp
- Schofield CJ. 2001. *Field Testing and Evaluation of Insecticides for Indoor Residual Spraying Against Domestic Vectors of Chagas Disease*. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2001.1. Geneva: WHO
- Schofield CJ & Dolling WR. 1993. *Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera)*. In: *Medical Insects and Arachnids* (R. P. Lane & R. W. Crosskey, eds.), pp. 483-516, London: Chapman & Hall.
- Schofield CJ, Jannin J y Salvatella R. 2006. *The future of Chagas disease control. Trends in parasitology*. 22(12): 583-589.
- Sousa OE, Samudio F, de Juncá C, Calzada JE. 2006. *Molecular characterization of human Trypanosoma isolates from endemic areas in Panamá. Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(4): 455-457.
- Stehling FB, Diotaiuti L, Romanha AJ, Bezerra CM, de Menezes E. 2007. *First report on the occurrence of Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine Rhodnius nasutus Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(5): 643-646
- Stoppani A. 1999. *Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Medicina*. 59 (2): 147-165
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL y de Lana M. 2003. *Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes. Antimicrob. Chemother.* 53: 1045-1053
- Urdaneta-Morales S, Tejero F 1992. *Trypanosoma rangeli (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 511-516.

- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sánchez 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*
- World Health Organization, 2000. *Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health (GCDPP)–Challenge of Chagas Disease Vector Control in Central America*. Geneva: World Health Organization.
- Zeledón R, Rabinovich JE 1981. *Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol 26: 101-133.*
- Zingales BR, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Cansen A. y Fernández O. 1998. *Molecular epidemiology of American tripanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon genes secuencies. Inst. J. Parasitol. 28: 105-112*

XI. APÉNDICE

A. Condiciones de PCR optimizadas para análisis de muestras

1. Reacción externa. La amplificación se realizó utilizando un volumen final de 20 μ L con 1 μ L de ADN; 0.20 μ M de cada cebador KMe1_F(5'-TTC TGT ACT ATA TTG GTA-3') y KMe1_R(5'-CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3'); mix de dNTPs 0.15mM c/u; 1.5mM de MgCl₂(CLP), 0.04U/ μ L de Taq Polimerasa (CLP) en Buffer de Amonio 1X (CLP). Se agregó 2 gotas de aceite mineral a cada tubo, con una pipeta de 1000 μ l. El programa de amplificación (Icycler Biorad, Hercules, CA) consistió en desnaturalización inicial a 94° C por 5 min., seguido de 30 ciclos de: desnaturalización 30 seg a 94° C, hibridación 30 seg a 48° C, extensión 30 seg a 72° C. Por último una extensión final de 10 min a 72° C.

2. Reacción interna múltiplex. La reacción interna se preparó con: 1 μ L de ADN de la reacción externa, cebadores TC1_F(5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'), TC3_F(5'-CCG CGA ACA ACC CCT AAT AAA AAT G-3'), TR_F(5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3'), ME_R(5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3') todos 0.15 μ M; mix de dNTPs 0.15mM c/u; 1.5mM de MgCl₂(CLP, San Diego, CA); 0.04U/ μ L de Taq Polimerasa (CLP, San Diego, CA) en Buffer de Amonio 1x (CLP, San Diego, CA). El programa de amplificación (Icycler Biorad, Hercules, CA) consistió en desnaturalización inicial a 94° C por 5 min., seguido de 30 ciclos de: desnaturalización 30 seg a 94° C, hibridación 30 seg a 55° C, extensión 30 seg. a 72° C. Por último una extensión final de 10 min a 72° C. Los productos de amplificación son de 200pb para *T. cruzi* I, 150pb para *T. cruzi* Zimodemo 3 y 100 pb para *T. rangeli*.

3. Reacción interna para *T. cruzi* II. Se utilizó el producto de la reacción externa del PCR anidado anterior para realizar el PCR interno. La reacción interna se preparó usando: 1 μ L de ADN, cebadores TC2F (5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCA T-3') y ME_R a 0.15 μ M c/u; dNTPs 0.15mM c/u; 1.5mM de MgCl₂(CLP, San Diego, CA); 0.04U/ μ L de Taq Polimerasa (CLP, San Diego, CA) en Buffer de Amonio 1x (CLP, San Diego, CA). El programa de amplificación (Icycler Biorad, Hercules, CA) consistió en desnaturalización inicial a 94° C por 5 min., seguido de 30 ciclos de: desnaturalización 30 seg a 94° C, hibridación 30 seg a 55° C, extensión 30 seg a 72° C. Por último una extensión final de 10 min a 72° C. El producto de amplificación es de 250 pb.

B. Datos de los cebadores utilizados para esta tesis

Cuadro15: Datos de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR

| Cebador | Secuencia (5' → 3') | T _m |
|---------------|-----------------------------------|----------------|
| KMe1 F | TTC TGT ACT ATA TTG GTA | 46° C |
| kMe2 R | CAA TAT AGT ACA GAA ACT G | 50° C |
| TC1 F | ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G | 68° C |
| TC2 F | TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCA T | 70° C |
| TC3 F | CCG CGA ACA ACC CCT AAT AAA AAT G | 72° C |
| TR F | CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G | 66° C |
| ME R | TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G | 58° C |

* Los colores se utilizan para indicar la posición de los cebadores en las alineaciones del ADN de *T. cruzi*

C. Alineación de los cebadores utilizados en ésta tesis

Figura 21. Alineación para producto externo utilizando los cebadores kMe1F y kMe2R

```
>gi|10627|emb|X00632.1| Trypanosome cruzi mini-exon repeat
AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTGGTACGCGAAGCTTCCAAATCCGCGAGTCGCGGGCTA
TGTTTGGTCAATTTCTTTTGACCGGGGTCCACGAACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TATATATATGGTGCCCTCCCATACATATATATATATATATACACACCTGCAGGCACACGTGTGTGTGTGTAT
GTATGTGTGTGTGCCCCACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCGCAAG
```

CACGGTGTCTGTCTGTCCGTCTCGCTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTTACGGTGTGGC
 CTGCGTTTTTTGGTGTTTTTCTGCTTTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCGTGCACACA
 CCGCTCCGCACGCATTAGTCGCGTGTGTTCCGCCCCCGACACTTTCTGTGGCGCTGATCGGGGGCGACT
 TCCCCGGCCCGGGACACCCAGTGTGGCCTGGGAGGGGGGAGTTTTGTACACGGGCCCTGTATCGCAAAAA
 AAACCCTCATCTAACTCGAAAACGGTGTGGGGACGCAACCTTTTTCAACTAACGCTATTATTGATACAGT
TCTGTACTATATTGGTACG

Figura 22. Alineación para producto interno *T. cruzi* Z3

>AF050523 *T. cruzi* MT4167 Z3
 atatgtgttctctccatgcttacatgcatatataatgtgtgtgtgcccctgcaccctcgtgcagccgccccgca
 gttttcccctccagtgttgactgtccccacgttccgtgtcggccctgcgctgtttcattcttgttgcgccc
 ggctttctttgtttgcgcccctgttgcctccgtgttttcccgctcgttccccctgttctccgcgcccctccg
 cgttttccgggtgctttgtgtttttttctctttcttgccttcgcacgcgctcgcccgcatttgcgctccac
 gctcgccggttgcgtccactgcccggccccgacgcccgtccgtggcgctgagcccgggggcgggcatcccggacc
 ggcaccctccccagtggtgcccgggggggaggggggacttttgtacacagcccgggtggcccggtacaac
 ccctaataaaaaatgggggttttgtacacgggtcccgggtgcccgcgaaaaaccctcatcaaatgtgaaagcgg
 gtgtggcgcaacaccactttcaactaacgctattattgatacagtttctgtactatattggta^{cgcgacgctt}
 ccaaccgcctctggcggttatgtttgggtcaatttcttttgaccggggtccacggacccttttttttttttt
 tt

Figura 23. Alineación para producto interno *T. cruzi* I

>X62674 *T. cruzi* Sylvio
 Atggtggcgccctcccatacatatatacacacacactgcagggcacacgtgtgtgtgtgtatgtgtgcccc
 cgcacccccggctccttcatgtttgtgtcgtcactgcccttgtctgcgcaagcacgggtgttctgtcttgtcc
 gtctcgtgcttttgtgttctcgcactccaccgcgcttttacgcggtgcccgcgcccctttggcgcttttctgc
 ttttttcccgtcttttggctcctcgcactgaaccgcccgcatacaccgtccgcacgcattagtcgcgcggtg
 tccgccccccaacactttctgtggcgctgatcgggggcgacttcccggcccggggacccccagtggtggcct
 gggagggggggaattttgtacacggggccagcatcgcaaaaaaccctcatcaaatgtgaaagcgggtccgg
 gcccgaactttttcaactaacgctattattgatacagtttctgtactatattggta^{cgcggaagcttccaaat}
 ccgcgagtcgcggttatgtttgggtcaatttcttttgaccggggtccacggacccttttttttttttttttt
 ttttt

Figura 24. Alineación para híbrido (*T. cruzi* I y II) cepa CL Brener

>gi|163881462|ref|NZ_AAHK01003512.1| *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener
 tcruzi_1047053504713, whole genome shotgun sequence
 CATCACGAATGCGTACGATATGATAGTGGCGGACACTCTGGCGGCCATGCTGCGTGGAAACGTGCACGTG
 TTCAACGCAGCATGCGGCCGCGTGGGGCCGGGGTAAACACCCCGGGTAGGCGAGTACCCGGGCAACCCCT
 TGGGTAGCTGAGAGGCAATGAACACACAGAGGAAAGGGAAAATGCAGAAACAGAACTCACACATAAGGA
 AACTCGCCACCACAGAAAGCAGCAGGAAAACATCCACGGAACGGAGAGAATGCAGAGGTAATCAACGGCA
 CGGCAGGGTCAATTGCCCGAATGCGGAGAGCAGTTTTTGTATAATACCACGGTGCCCGTACCAAAGCCAA
 AGGATTCAAGAGGGGCTTCTTCTATACTTGTGGAATATGACGCCAAGAGGGTACAGGATGACTGTTTTT
 TCTCTTCTTATCCCTCCCGCCCGGGTTGGTTCCGATCATTGTTTTGCTTTTTGCTTTTTACTTGTTTGGCG
 GGCAGGTACGTTTTTACAATGGGTATGGGGTTAATAACTTTTTGGGGAGTGTGGTGGGGTGTGGTGT
 GGAAATGGAGGCCATGTAGTTGGTCACAGAATCGGTGCGATCAGGTCCGGGCACCACTTCCGGTGTGGG
 ACGACCTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTATTGATACAGTTTTCTGTACTATATTGGT
 ACGCGAAGCTTCAACCCGCCTCTGGCGGTTATGTTTGGTCAATTTCTTTTGACCGGGGTCTACGGACCC

CTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGGGTCTGTCCGCCATATATACATATACCCCTATATATATATATACCCAT
 ATATATATAGCCCCGTACCCCTCGTGGGCTGCCCCCCCCCCCCCCCCACATTGCGTGTCCGCCACCTCC
 TTCGGGCCCCCTCATTTTTCGCTTCATGGCTGCTATTGCCTGCATCTTTGTTTTGTTTTGTGTTTTCTCTC
 TCCCGTTCCTTTTATTCCCTTTTTCTCCGCGTATGCCGCGCTTCTTCTGTGTTTTCCGGTGTTTTTGCT
 TTGCTCGCACACTCGGCTGCATTTGCTGTTCCACACTCCCCATGTGCGTCTTTTTCCGCCCCCTGACGCCG
 TCCACGGCGCTATCCCGGGGCGGACATCCCGGACCCTGACCCCTCCCCAGTGTGGCCTGGGAGGGGGGGG
 GGGGGGTTTTGTACACGGTCCCAAGTGCCGCGAAGGACCCCTCATCAAAATTGAAAACCGTTGTGGAACA
 CAACTCCTTTCAACTAACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTTTCAAATCCTGTTCTGTGATAATTATTTAC
 ACAGTTCTGTTTCAAACCTGTTCTGTGATAAACTTTTCCAATTTTGTCTTAGCCATTTTTTTGATTTAT
 TTTTTAGGTTTTCAAGAAAGACGTCGGAACCTTTAACCTATAAGCCGGTGTGTATCCGACGCCGTTTTCG
 AAACCTACTTGAGCAAAACTTTTTTTTTGTCTTAGTCATTTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAATTTTTTTTTTTTTGTCAATTTGACTAGTGTATTTTTGACGCGAGTGCAAAACCTACTGGGCAAAAGAA
 ATTTTTTTTGACTTTATCATCGTTTTCAAAAAATCTGAAAAATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAATAA
 TAATAAAAATATTCATATATATCTATATATATAGTGATTGGTTTTATTTTTGACGCTGTATCAACCTACT
 TGATAACAATTTTTGTGGTCCGACTCTAAATACGTAATATAAAAGGATACAAGAGCTCCTTTTACTCAGC
 TGAGATCGGCGTACGTGTTTGGTGCTTGACAATAAACTATTGTAAATAAGAAAAAAAAAGAAAAAGGAAAA
 ACAAATCAACAGAGGCAAAATTAGCAGAACTAACATACAGTTTCATTAGGCACAAAGAGATACTCATAGC
 GGTAAAACGGATCAATTTGGTAGAAAAATTAATACTTTGTGAGCTCTTTGAATACTCTTATAATAAGAT
 TTAGGAAAAGAACTACCCTCTTTTCTGTAGTTCACACCAACAAGAAGAAATAGGCAGTGACGAGTATTGG
 TTGTCCGAGATCGTTGTTGGTAATCAATAAACAATCGAAGAGGTTGAGTTAAATACCTGTTTTGAAAAT
 AAAATTTTTGAGGGTCTATCTGTGACCAGTTTTCTCGTATTTTTAAGGAAAGAAAATATCATTGTGGAT
 ATAAAAGATATTGTACAGAGAGGGCATCGATACTCATCGGATTTGGGAGATCGATATTATTTGGTAAAC
 AATTTAGATCGCGTGAGTCACCGGAAAAGTACCCCTTCTGGAAAATAAAAATTTTTGAGGGTCTATCT
 GTGACCAGTTTCTAGAGTGTGATAAGAATATTATTAATTATTGGGAACAAGAGAGAGAACAGAAAGGAT
 ATTGACGATTATTGTTTGGTGGAGATCGTTGTTAATAATCAGCGAAGAATCGAAGAAGTAATAAAGAAGA
 GAATTGACGACTGCGTCATTTGGCAGAACACGGATATTGGACAGCGTATTGGATAGGGAGTGAAGGGTCT
 TTGGGTTCCGATCCATTGACGCTGCTCGTTATACGTTGTTGCACGGACAATTACTATATCCAGGATACTAA
 CTATCACGGCCTGGCAAACCAGGACTCGGCAGATACATCTTACGTTGGTAAGTATTATGGCCTACTCCA
 AGCGAGGAATGCCAATGCCTTTTGACTTTTCGCAACGGGAGGATGGACAATGACTGACGACGAGGGGAG
 CGGCAACAACCACCAGGTATATGACACGGTCAAGGCTGCGTCAAGAATTCGGTTTTATCCACCGAGAC
 AACGTGGATCCATCTCAGCTTCCAGGATATCATTACTGCGGCAACGACAGAGGCTATCAAACCTGCTCACGT
 CCCCTACTAAGGGGCGATACACGGAGAACAATGGGAATCGCAGCTGGAGGTCAAGGAGTTGGCGCCGAA
 CAGAAGAGACGCAGA

gi|163909770|ref|NZ_AAHK01028911.1| Trypanosoma cruzi strain CL Brener
 tcruzi_1047053450709, whole genome shotgun sequence
 ACGGCGTTGCCTGCGTTTTTTTTGGTGTCTTTCTGCTTTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGC
 GTGCATACACCGCTCCGCACGCATTAGTCGCGTGTGTTCCGCCCCCAACACTTTCTGTGGCGCTGATC
 GGGGGCGACTTCCCGGCCCCGGGACCCCCAGTGTGGCCTGGGAGGGGGGAATTTTTGTACACGGGCCCCG
 CATCGCAAAAAAACCCCTCATCAAATTTGAAAGCGGTCCGGGCCCCGAACTTTTTCAACTAACGCTATTA
 TTGATACAGTTTTCTGTACTATATTGGTACGCGAAGCTTCCAAATCCGCGAGTCCGCGTTATGTTTGGTCA
 ATTTCTTTTACCAGGGTCCACGGACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGGT
 GCGGCCCTCCCATACATATATATATACACACCTGCAGGCACACGTGTGTGTGTGTATGTGTGCCCCACGC
 ACCCCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTGCTCACTGCCCTTGTCTGCGCAAGCACGGTGTCTGTCTTGTCCG
 TCTCGCTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTTACGGCGTTGCCTGCGTTTTTTGGTGTTTTTT
 TGCTTTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCATACACCGCTCCGCACGCATTAGTCGC
 GTGGTC

D. Preparación de Reactivos

1. Buffer de lisis 2X, para extracción de ADN:

| | | Concentración final |
|----------------|--------|---------------------|
| Tris 1M pH 7.4 | 0.2 mL | 20mM |
| NP-40 (IPEGAL) | 0.1 mL | 1% |
| Tween 20 | 0.1 mL | 1% |
| Agua destilada | 9.6 mL | |
| TOTAL | 10 mL | |

Filtrar con un filtro de 0.22µm, almacenar a temperatura ambiente

2. Buffer de lisis con proteinasa K:

1 ml buffer de lisis 2x

5.5µl de proteinasa K(36.66mg/ml).

Se prepara fresco, antes de cada uso

3. Buffer TBE 10X:

Para un volumen final de 250 mL:

$$250mlTBE\left(\frac{108gTrisBase}{1000mlTBE}\right) = 27gTrisBase$$

$$250mlTBE\left(\frac{55gÁcidoBórico}{1000mlTBE}\right) = 13.75gÁcidoBórico$$

$$250ml\left(\frac{40mlEDTA0.5M}{1000mlTBE}\right) = 10mlEDTA0.5M$$

Se disuelven las sales en aproximadamente 150 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 250mL.

4. Solución stock de acrilamida: Bis

Preparación de 50 ml de stock al 30% proporción 24:1 (24% + 1%=25%)

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

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

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

5. Gramos de reactivo necesario según proporción:

$$50\text{mlstock} \left(\frac{28.8\text{gacrilamida}}{100\text{mlstock}} \right) = 14.4\text{gacrilamida}$$

$$50\text{mlstock} \left(\frac{1.2\text{gbisacrilamida}}{100\text{mlstock}} \right) = 0.6\text{gbisacrilamida}$$

Usar guantes, mascarilla, bata y lentes. Trabajar bajo campana de extracción. En tibia 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.

6. Preparación de APS al 25 %

Mezclar 0.125g de APS + 500 uL de agua dd. Alicuotar y guardar a -20°C.

E. Procedimiento electroforesis en geles de poliacrilamida

1. Preparación de las placas:

- a. Seleccionar las placas, una grande y una pequeña
- b. Lavar las placas de ambos lados con una soluciónalconox al 1%, usando una esponja que se utilice únicamente para placas. Quitar el jabón con agua dd y secar con pañuelos desechables pequeños (kimwipes) a modo que no quede mota. Junto con las placas lavar los peines.
- c. Agregarles etanol al 95% lavando con agua dd, no frotar, secar con pañuelos desechables.
- d. Montar las placas según instrucciones del fabricante.
- e. 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.

2. Preparación del gel:

- a. Mezclar las cantidades necesarias de agua, acrilamida al 30% (tóxico) y TBE 10X.
- b. 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.
- c. 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 degasificación sea efectiva. Agregar de Temed y APS 25%. 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 colocarle en la superficie buffer TBE 0.5X para que no se deshidrate.

F. Muestras de heces utilizadas para ésta tesis y resultado obtenido

Cuadro 16: Muestras de heces preservadas en seco de Jalapa y Zacapa

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infeción * | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|--------|-----------------|--------------|------------------|------------------------|---------------------|-------------|----------|----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | gland. rec. | TCII | TCI | |
| 1h | 21-001-1-D-6 | Jalapa | San Pedro Pinula | Aldea Pie de la Cuesta | <i>T. dimidiata</i> | + | + | + | - |
| 2h | 21-002-8-D-1 | Jalapa | San Pedro Pinula | Aldea Pie de la Cuesta | <i>T. dimidiata</i> | + | + | + | - |
| 3h | 21-027-04-D-18 | Jalapa | San Pedro Pinula | Caserío Las Olivas | <i>T. dimidiata</i> | + | - | - | - |
| 4h | 21-027-04-D-32 | Jalapa | San Pedro Pinula | Caserío Las Olivas | <i>T. dimidiata</i> | + | - | - | - |
| 6h | 21-113-4-D-3 | Jalapa | Monjas | Caserío Las Lomas | <i>T. dimidiata</i> | ++ | - | - | - |
| 7h | 21-113-4-D-4 | Jalapa | Monjas | Caserío Las Lomas | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | - | - |
| 8h | 21-113-4-D-5 | Jalapa | Monjas | Caserío Las Lomas | <i>T. dimidiata</i> | ++ | - | - | - |
| 9h | 21-113-4-D-6 | Jalapa | Monjas | Caserío Las Lomas | <i>T. dimidiata</i> | ++ | - | - | - |
| 10h | 21-113-6-D-3 | Jalapa | Monjas | Caserío Las Lomas | <i>T. dimidiata</i> | ++ | - | + | - |
| 11h | 21-118-14-D-2 | Jalapa | Monjas | Aldea Llano Grande | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | + | - |
| 12h | 21-017-146-R-23 | Jalapa | San Pedro Pinula | Aldea La Ceiba | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - |
| 13h | 21-122-15-D-1 | Jalapa | Monjas | Aldea San Antonio | <i>T. dimidiata</i> | +++ | - | - | - |
| 14h | 21-017-146-R-24 | Jalapa | San Pedro Pinula | Aldea La Ceiba | <i>R. prolixus</i> | ++ | - | - | +(pálida) |
| 15h | 19-231-66-R6 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | +(pálida) |
| 16h | 19-231-72-R9 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - |
| 17h | 19-231-72-R32 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | ++ | - | - | - |
| 18h | 19-231-72-R39 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | +++ | - | - | +(pálida) |
| 19h | 21-162-4-D-1 | Jalapa | Mataquescuintla | Caserío Agua Tibia | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | + | - |
| 20h | 21-122-17-D-1 | Jalapa | Monjas | Aldea San Antonio | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | + | - |
| 21h | 19-231-66-R3 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 22h | 19-231-66-R1 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 23h | 19-231-49-R11 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 24h | 19-231-49-R10 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 25h | 19-231-49-R7 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 26h | 19-149-38-D1 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cimarrón | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | - | - |

Continuación cuadro 16

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infección * gland. rec. | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|--------|---------------|--------------|-----------|----------------------------|---------------------|----------------------------|----------|-----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | | TCII | TCI | |
| 27h | 19-132-5-R9 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 28h | 19-133-33-R5 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 29h | 19-230-25-R1 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 30h | 19-231-49-R3 | Zacapa | Usumatlán | Aldea el Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 31h | 19-133-33 R20 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 32h | 19-151-20 D1 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cimarrón | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | - | - |
| 33h | 19-001-39 R6 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 34h | 19-001-39 R7 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | + | - | +(pálida) | + |
| 35h | 19-001-39 R11 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 36h | 19-001-39 R14 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 37h | 19-001-39 R17 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 38h | 19-001-39 R19 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | +(pálida) | + |
| 39h | 19-001-39 R20 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 40h | 19-001-39 R24 | Zacapa | La Unión | Aldea Peña Blanca | <i>R. prolixus</i> | + | - | + | + |
| 41h | 19-131-24-R1 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | + |
| 42h | 19-131-24-R2 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 43h | 19-131-24-R4 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 44h | 19-131-24-R7 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 45h | 19-131-20-R4 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | + | + | - |
| 46h | 19-131-20-R5 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 47h | 19-132-5-R2 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | ++ | + | + | - |
| 48h | 19-132-5-R3 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | + | - | + | - |
| 49h | 19-132-5-R5 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 50h | 19-132-5-R7 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 51h | 19-132-5-R8 | Zacapa | Zacapa | Aldea Cerro Grande | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | + | - |
| 52h | 19-171-47-D1 | Zacapa | Río Hondo | Aldea Santa Rosalía Mármol | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | - | - |
| 53h | 19-188-7-D1 | Zacapa | Río Hondo | Cenegal | <i>T. dimidiata</i> | +/2 | - | + | - |
| 54h | 19-188-7-D5 | Zacapa | Río Hondo | Cenegal | <i>T. dimidiata</i> | + | - | - | - |

Continuación cuadro 16

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infección * gland. rec. | Linaje 1 | | Linaje 2 | |
|--------|---------------|--------------|-----------|----------------|--------------------|----------------------------|----------|-----|-------------------|--|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | | TCII | TCI | <i>T. rangeli</i> | |
| 55h | 19-230-32-R1 | Zacapa | Usumatlán | Aldea El Chico | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 56h | 19-230-32-R11 | Zacapa | Usumatlán | Aldea El Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - | |
| 57h | 19-230-32-R14 | Zacapa | Usumatlán | Aldea El Chico | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - | |

+ y -) muestras positivas y negativas respectivamente mediante PCR del mini exón. * Infección glándula rectal: número de parásitos/ml en cada muestra: (+/2) 1.9×10^5 - 3.1×10^5 , (+) 3.1×10^5 - 1.25×10^6 , (++) 1.25×10^6 - 2.5×10^6 , (+++) mayor a 2.5×10^6 gen del

Cuadro 17: Muestras de heces preservadas en urea de Chiquimula

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infección * gland. rect. | Linaje 1 | | Linaje 2 | |
|--------|-----------------|--------------|-----------|----------------------|--------------------|-----------------------------|----------|------|-------------------|--|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | | TC II | TC I | <i>T. rangeli</i> | |
| 11 | 20-046-39-R-2 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | ++ | - | - | - | |
| 15 | 20-030-3-R-51 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 16 | 20-030-5-R-9 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 17 | 20-046-39-R-6 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 18 | 20-048-28-R-1 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + | |
| 20 | 20-048-28-R-22 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + | |
| 21 | 20-004-47-R-1 | Chiquimula | Olopa | Aldea El Carrizal | <i>R. prolixus</i> | +++ | - | - | + | |
| 23 | 20-021-8-R-5 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Quebracho | <i>R. prolixus</i> | ++ | - | - | + | |
| 26 | 20-001-19-R-2 | Chiquimula | Olopa | Aldea El Carrizal | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + | |
| 27 | 20-021-8-R-2 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Quebracho | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + (pálida) | |
| 28 | 20-048-28-R-25 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 29 | 20-049-102-R-18 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + (pálida) | |
| 30 | 20-076-93-R-11 | Chiquimula | Jocotán | Aldea Orégano | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - | |
| 31 | 20-004-47-R-3 | Chiquimula | Olopa | Aldea El Carrizal | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - | |
| 32 | 20-129-5-R-4 | Chiquimula | Olopa | Aldea La Prensa | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - | |
| 33 | 20-130-10-R-3 | Chiquimula | Olopa | Aldea La Prensa | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + | |

Continuación cuadro 17

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infección * gland. rect. | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T.rangeli</i> |
|--------|----------------|--------------|-----------|-------------------|--------------------|-----------------------------|----------|----------|------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | | TC II | TC I | |
| 34 | 20-030-3-R-3 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 35 | 20-030-3-R-5 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + (pálida) |
| 36 | 20-030-3-R-6 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 37 | 20-030-3-R-11 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 38 | 20-030-3-R-18 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 40 | 20-030-3-R-25 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 41 | 20-030-3-R-31 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 42 | 20-030-3-R-37 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 43 | 20-030-3-R-38 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 44 | 20-030-3-R-44 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 45 | 20-030-3-R-48 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 46 | 20-030-3-R-52 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 47 | 20-030-3-R-59 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 48 | 20-030-3-R-62 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 49 | 20-030-3-R-64 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 50 | 20-030-6-R-3 | Chiquimula | Camotán | Caserío El Limar | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 51 | 20-035-10-R-4 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Tular | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 52 | 20-046-54-R-1 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 53 | 20-046-54-R-3 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 55 | 20-046-39-R-1 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 56 | 20-046-39-R-10 | Chiquimula | Camotán | Aldea El Anicillo | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 58 | 20-048-28-R-5 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | + |
| 59 | 20-048-28-R-6 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 60 | 20-048-28-R-8 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 61 | 20-048-28-R-23 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 62 | 20-048-28-R-24 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 64 | 20-048-28-R-24 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 65 | 20-048-28-R-30 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |

Continuación cuadro 17

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Infección * gland. rect. | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|--------|-----------------|--------------|------------|------------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | | TC II | TC I | |
| 67 | 20-049-102-R-2 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | - |
| 68 | 20-049-102-R-11 | Chiquimula | Camotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 70 | 20-076-92-R-12 | Chiquimula | Jocotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 74 | 20-076-93-R-8 | Chiquimula | Jocotán | Dos Quebradas | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 76 | 20-182-7-R-42 | Chiquimula | Chiquimula | Caserío El Rincón de Santa Bárbara | <i>R. prolixus</i> | +/2 | - | - | - |
| 99 | 20-027-6 R2 | Chiquimula | Camotán | | <i>R. prolixus</i> | + | - | - | + |
| 100 | 20-021-6 R5 | Chiquimula | Camotán | | <i>R. prolixus</i> | ++ | - | - | - |

+ y -muestras positivas y negativas respectivamente mediante PCR del gen del mini exón. * Infección glándula rectal: número de parásitos/ml en cada muestra: (+/2) 1.9×10^5 - 3.1×10^5 , (+) 3.1×10^5 - 1.25×10^6 , (++) 1.25×10^6 - 2.5×10^6 , (+++) mayor a 2.5×10^6

Cuadro 18: Muestras de cultivos de tracto digestivo de *T. dimidiata*

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|--------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------|----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | TCII | TCI | |
| 2c | 22-015-5 D1 | Jutiapa | El adelanto | Las trojas | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 3c | 22-013-4 D7 | Jutiapa | El adelanto | Río Chiquito | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 4c | 22-012-8 D1 | Jutiapa | El adelanto | Cerro de Piedra | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 6c | 22-009-37 D1 | Jutiapa | El adelanto | El Zarón | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 8c | 22-011-6A D1 | Jutiapa | El adelanto | Cerro de Piedra | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 9c | 22-011-6A D3 | Jutiapa | El adelanto | Cerro de Piedra | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 10c | 19-111-10 D1 | Zacapa | Huité | San Miguel | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 15c | Bote 9 D2 | Jutiapa | Acatempa | | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 18c | 20-095-16 D1 | Chiquimula | San Juan Ermita | Encuentros | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 20c | 22-027-15 D2 | Jutiapa | Yupiltepeque | El Sauce | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 23c | 6-015-12 D1 | Santa Rosa | Cuilapa | El pinito | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 25c | 6-001-4 D3 | Santa Rosa | Barberena | Bijaques | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |

Continuación cuadro 18

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|--------|---------------|--------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------|----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | TCII | TCI | |
| 26c | 6-026-5 D3 | Santa Rosa | Cuilapa | Laguna Seca | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 27c | 6-024-9 D2 | Santa Rosa | Cuilapa | San Juan Arana | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 29c | 6-030-6 D1 | Santa Rosa | Santa Rosa de Lima | Rinconcito | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 30c | 6-060-8 D14 | Santa Rosa | San Rafael las Flores | Estanzuela | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 33c | 6-067-5 D16 | Santa Rosa | Casillas | Llano Grande | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 34c | 6-067-5 D18 | Santa Rosa | Casillas | Llano Grande | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 35c | 6-079-1 D3 | Santa Rosa | San Juan Tecuaco | El coyolito | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 36c | 20-159-10 D2 | Chiquimula | Quetzaltepeque | El Limón | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 39c | 20-220-4 D1 | Chiquimula | Concepción Las Minas | Jícaro | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 42c | 22-090-80 D1 | Jutiapa | Jutiapa | El coyol | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 43c | 22-071-2 D2 | Jutiapa | Zapotitlán | Canoas | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 44c | 6-086-24 D8 | Santa Rosa | San Juan Tecuaco | La Basa | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 45c | 22-127-38 D2 | Jutiapa | Comapa | Madre Cacao | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 46c | 6-144-32 D4 | Santa Rosa | Santa Cruz El Naranjo | Agua Blanca | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 48c | 22-055-7 D1 | Jutiapa | Zapotitlán | Zapotitlancito | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 49c | 6-121-9 D2 | Santa Rosa | Santa María Ixhuatán | Media Legua | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 50c | 22-154-139 D1 | Jutiapa | El Progreso | Morán | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 51c | 22-184-7 D1 | Jutiapa | Agua Blanca | Calderas | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 52c | 22-183-3 D1 | Jutiapa | Agua Blanca | Calderas | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 53c | 6-295-1 D2 | Santa Rosa | Oratorio | El Amatillo | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 54c | 6-303-1 D1 | Santa Rosa | Oratorio | Los talpetates | <i>T. dimidiata</i> | - | + | - |
| 55c | 22-218-83 D2 | Jutiapa | Asunción Mita | Lomas de Chavarría | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 56c | 22-218-76 D1 | Jutiapa | Asunción Mita | Lomas de Chavarría | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 57c | 22-360-2 D1 | Jutiapa | Quezada | Los Ranchos | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 58c | 22-381-22 D2 | Jutiapa | San José Acatempa | Tunillas | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 59c | 21-045-12 D1 | Jalapa | San Luis Jilotepeque | San Felipe | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |

Continuación cuadro 18

| Número | ID | Ubicación | | | Vector | Linaje 1 | Linaje 2 | <i>T. rangeli</i> |
|---------------------|---------------|--------------|------------------|--------------------|---------------------|----------|----------|-------------------|
| | | Departamento | Municipio | Localidad | | TCII | TCI | |
| 60c | 22-310-7 D3 | Jutiapa | Jerez | El Rescate | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 61c | 22-324-292 D5 | Jutiapa | Atescatempa | Contepeque | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 62c | 22-327-69 D6 | Jutiapa | Atescatempa | Contepeque | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 63c | 22-327-69 D4 | Jutiapa | Atescatempa | Contepeque | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 64c | 6-356-6 D1 | Santa Rosa | Nueva Santa Rosa | Anonillo | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| 65c | 6-352-10 D1 | Santa Rosa | Nueva Santa Rosa | Concepción Zacuapa | <i>T. dimidiata</i> | + | + | - |
| Metacíclicos | | | | | | | | |

+ y -)muestras positivas y negativas respectivamente mediante PCR del gen del mini exón

G. Código SAS: Valores predictivos para tablas de contingencia.

1. *Rhodnius prolixus*

```

data TCIPredTCII;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 35
0 1 0
1 0 11
1 1 2
;
proc sort data=TCIPredTCII;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data= TCIPredTCII order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Response=1;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Sensitivity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Response=0;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Specificity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Test=1;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Positive predictive value';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Test=0;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Negative predictive value';
run;

```

2. *Triatoma dimidiata*

```

data TCIPredTCII;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 0
0 1 0
1 0 8
1 1 3
;
proc sort data=TCIPredTCII;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data= TCIPredTCII order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Response=1;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Sensitivity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Response=0;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Specificity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Test=1;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Positive predictive value';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Test=0;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Negative predictive value';
run;

```

3. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*

```

data TCIPredTCII;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 35
0 1 0
1 0 19
1 1 5
;
proc sort data=TCIPredTCII;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data= TCIPredTCII order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Response=1;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Sensitivity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Response=0;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Specificity';
run;
proc freq data=TCIPredTCII order=data;
where Test=1;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Positive predictive value';
run;
proc freq data=TCIPredTCII;
where Test=0;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Negative predictive value';
run;

```

4. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*

```

data TCIIpredTCI;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 35
0 1 19
1 0 0
1 1 5
;
proc sort data=TCIIpredTCI;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data= TCIIpredTCI order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;
proc freq data=TCIIpredTCI order=data;
where Response=1;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Sensitivity';
run;
proc freq data=TCIIpredTCI;
where Response=0;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Specificity';
run;
proc freq data=TCIIpredTCI order=data;
where Test=1;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Positive predictive value';
run;
proc freq data=TCIIpredTCI;
where Test=0;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Negative predictive value';
run;

```

5. *Rhodnius prolixus*

```

data TrpredTc;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 0
0 1 9
1 0 35
1 1 4
;
proc sort data=TrpredTc;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data=TrpredTc order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;
proc freq data=TrpredTc order=data;
where Response=1;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Sensitivity';
run;
proc freq data=TrpredTc;
where Response=0;
weight Count;
tables Test;
exact binomial;
title 'Specificity';
run;
proc freq data=TrpredTc order=data;
where Test=1;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Positive predictive value';
run;
proc freq data=TrpredTc;
where Test=0;
weight Count;
tables Response;
exact binomial;
title 'Negative predictive value';
run;

```

H. Resultados SAS: Análisis de valor predictivo

1. *Rhodnius prolixus* (TCI predice TCII)

Valor predictivo positivo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
|----------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 2 | 15.38 | 2 | 15.38 |
| 0 | 11 | 84.62 | 13 | 100.00 |

Bi nomial Proporti on
for Response = 1

| | |
|-------------------------------|---------|
| Proporti on (P) | 0.1538 |
| ASE | 0.1001 |
| 95% Lower Conf Limi t | 0.0000 |
| 95% Upper Conf Limi t | 0.3500 |
| Exact Conf Limi ts | |
| 95% Lower Conf Limi t | 0.0192 |
| 95% Upper Conf Limi t | 0.4545 |
| Test of H0: Proporti on = 0.5 | |
| ASE under H0 | 0.1387 |
| Z | -2.4962 |
| One-si ded Pr < Z | 0.0063 |
| Two-si ded Pr > Z | 0.0126 |
| Exact Test | |
| One-si ded Pr <= P | 0.0112 |
| Two-si ded = 2 * One-si ded | 0.0225 |
| Sample Si ze = 13 | |

Valor Predictivo Negativo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | Cumulative Percent |
|----------|-----------|---------|----------------------|--------------------|
| 0 | 35 | 100.00 | 35 | 100.00 |

Binomial Proportion
for Response = 0

| | |
|----------------------|--------|
| Proportion (P) | 1.0000 |
| ASE | 0.0000 |
| 95% Lower Conf Limit | 1.0000 |
| 95% Upper Conf Limit | 1.0000 |

| | |
|----------------------|--------|
| Exact Conf Limits | |
| 95% Lower Conf Limit | 0.9000 |
| 95% Upper Conf Limit | 1.0000 |

Test of H0: Proportion = 0.5

| | |
|-------------------|--------|
| ASE under H0 | 0.0845 |
| Z | 5.9161 |
| One-sided Pr > Z | <.0001 |
| Two-sided Pr > Z | <.0001 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| Exact Test | |
| One-sided Pr >= P | 2.910E-11 |
| Two-sided = 2 * One-sided | 5.821E-11 |

Sample Size = 35

2. *Rhodnius prolixus* (*T. rangeli* predice *T. Cruzei*)

Valor Predictivo Positivo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
|----------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 4 | 10.26 | 4 | 10.26 |
| 0 | 35 | 89.74 | 39 | 100.00 |

Binomial Proportion
for Response = 1

| | |
|------------------------------|-----------|
| Proportion (P) | 0.1026 |
| ASE | 0.0486 |
| 95% Lower Conf Li mit | 0.0073 |
| 95% Upper Conf Li mit | 0.1978 |
| Exact Conf Li mits | |
| 95% Lower Conf Li mit | 0.0287 |
| 95% Upper Conf Li mit | 0.2422 |
| Test of H0: Proportion = 0.5 | |
| ASE under H0 | 0.0801 |
| Z | -4.9640 |
| One-si ded Pr < Z | <.0001 |
| Two-si ded Pr > Z | <.0001 |
| Exact Test | |
| One-si ded Pr <= P | 1.677E-07 |
| Two-si ded = 2 * One-si ded | 3.353E-07 |
| Sample Si ze = 39 | |

Valor Predictivo Negativo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
|----------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 9 | 100.00 | 9 | 100.00 |

Bi nomi al Proporti on
for Response = 1

| | |
|-------------------------------|--------|
| Proporti on (P) | 1.0000 |
| ASE | 0.0000 |
| 95% Lower Conf Limi t | 1.0000 |
| 95% Upper Conf Limi t | 1.0000 |
| Exact Conf Limi ts | |
| 95% Lower Conf Limi t | 0.6637 |
| 95% Upper Conf Limi t | 1.0000 |
| Test of H0: Proporti on = 0.5 | |
| ASE under H0 | 0.1667 |
| Z | 3.0000 |
| One-si ded Pr > Z | 0.0013 |
| Two-si ded Pr > Z | 0.0027 |
| Exact Test | |
| One-si ded Pr >= P | 0.0020 |
| Two-si ded = 2 * One-si ded | 0.0039 |
| Sampl e Si ze = 9 | |

3. *Triatoma dimidiata* (TCI predice TCII)

Valor Predictivo Positivo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
|----------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 3 | 27.27 | 3 | 27.27 |
| 0 | 8 | 72.73 | 11 | 100.00 |

Bi nomial Proportion
for Response = 1

| | |
|------------------------------|---------|
| Proportion (P) | 0.2727 |
| ASE | 0.1343 |
| 95% Lower Conf Limit | 0.0095 |
| 95% Upper Conf Limit | 0.5359 |
| Exact Conf Limits | |
| 95% Lower Conf Limit | 0.0602 |
| 95% Upper Conf Limit | 0.6097 |
| Test of H0: Proportion = 0.5 | |
| ASE under H0 | 0.1508 |
| Z | -1.5076 |
| One-sided Pr < Z | 0.0658 |
| Two-sided Pr > Z | 0.1317 |
| Exact Test | |
| One-sided Pr <= P | 0.1133 |
| Two-sided = 2 * One-sided | 0.2266 |
| Sample Size = 11 | |

4. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (TCI predice TCII)

Valor Predictivo Positivo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
|----------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 5 | 20.83 | 5 | 20.83 |
| 0 | 19 | 79.17 | 24 | 100.00 |

Bi nomi al Proporti on
for Response = 1

| | |
|------------------------|--------|
| Proporti on (P) | 0.2083 |
| ASE | 0.0829 |
| 95% Lower Conf Li mi t | 0.0459 |
| 95% Upper Conf Li mi t | 0.3708 |

| | |
|------------------------|--------|
| Exact Conf Li mi ts | |
| 95% Lower Conf Li mi t | 0.0713 |
| 95% Upper Conf Li mi t | 0.4215 |

Test of H0: Proporti on = 0.5

| | |
|--------------------|---------|
| ASE under H0 | 0.1021 |
| Z | -2.8577 |
| One-si ded Pr < Z | 0.0021 |
| Two-si ded Pr > Z | 0.0043 |

| | |
|-----------------------------|--------|
| Exact Test | |
| One-si ded Pr <= P | 0.0033 |
| Two-si ded = 2 * One-si ded | 0.0066 |

Sampl e Si ze = 24

Valor Predictivo Negativo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | Cumulative Percent |
|----------|-----------|---------|----------------------|--------------------|
| 0 | 35 | 100.00 | 35 | 100.00 |

Binomial Proportion
for Response = 0

| | |
|----------------------|--------|
| Proportion (P) | 1.0000 |
| ASE | 0.0000 |
| 95% Lower Conf Limit | 1.0000 |
| 95% Upper Conf Limit | 1.0000 |

| | |
|----------------------|--------|
| Exact Conf Limits | |
| 95% Lower Conf Limit | 0.9000 |
| 95% Upper Conf Limit | 1.0000 |

Test of H0: Proportion = 0.5

| | |
|-------------------|--------|
| ASE under H0 | 0.0845 |
| Z | 5.9161 |
| One-sided Pr > Z | <.0001 |
| Two-sided Pr > Z | <.0001 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| Exact Test | |
| One-sided Pr \geq P | 2.910E-11 |
| Two-sided = 2 * One-sided | 5.821E-11 |
| Sample Size = | 3 |

5. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (TCII predice TCI)

Valor Predictivo Positivo

| The FREQ Procedure | | | | |
|--------------------|-----------|---------|--------------------------|------------------------|
| Response | Frequency | Percent | Cumul ative Frequency | Cumul ative Percent |
| 1 | 5 | 100.00 | 5 | 100.00 |

| Bi nomi al Proporti on for Response = 1 | |
|--|--------|
| Proporti on (P) | 1.0000 |
| ASE | 0.0000 |
| 95% Lower Conf Limi t | 1.0000 |
| 95% Upper Conf Limi t | 1.0000 |
| Exact Conf Limi ts | |
| 95% Lower Conf Limi t | 0.4782 |
| 95% Upper Conf Limi t | 1.0000 |
| Test of H0: Proporti on = 0.5 | |
| ASE under H0 | 0.2236 |
| Z | 2.2361 |
| One-si ded Pr > Z | 0.0127 |
| Two-si ded Pr > Z | 0.0253 |
| Exact Test | |
| One-si ded Pr >= P | 0.0313 |
| Two-si ded = 2 * One-si ded | 0.0625 |
| Sample Si ze = 5 | |

Valor Predictivo Negativo

The FREQ Procedure

| Response | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | Cumulative Percent |
|----------|-----------|---------|----------------------|--------------------|
| 0 | 35 | 64.81 | 35 | 64.81 |
| 1 | 19 | 35.19 | 54 | 100.00 |

Binomial Proportion
for Response = 0

| | |
|----------------------|--------|
| Proportion (P) | 0.6481 |
| ASE | 0.0650 |
| 95% Lower Conf Limit | 0.5208 |
| 95% Upper Conf Limit | 0.7755 |

| | |
|----------------------|--------|
| Exact Conf Limits | |
| 95% Lower Conf Limit | 0.5062 |
| 95% Upper Conf Limit | 0.7732 |

Test of H0: Proportion = 0.5

| | |
|-------------------|--------|
| ASE under H0 | 0.0680 |
| Z | 2.1773 |
| One-sided Pr > Z | 0.0147 |
| Two-sided Pr > Z | 0.0295 |

| | |
|---------------------------|--------|
| Exact Test | |
| One-sided Pr >= P | 0.0201 |
| Two-sided = 2 * One-sided | 0.0402 |

Sample Size = 54