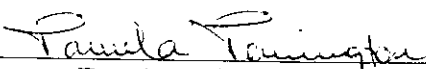
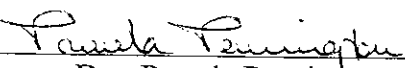


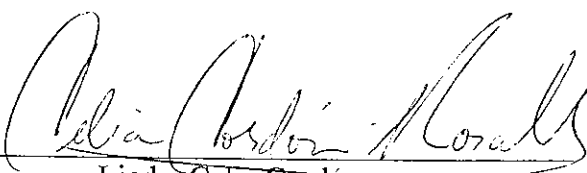
**Análisis de variabilidad génica de *Trypanosoma cruzi*
aislado de triatominos de cinco áreas endémicas de Guatemala**

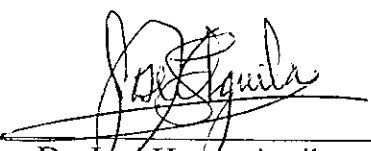
Vo.Bo.

(f) 
Dra. Pamela Pennington
Asesor

Tribunal:

(f) 
Dra. Pamela Pennington

(f) 
Licda. Celia Cordon

(f) 
Dr. José Hector Aguilar

Fecha de aprobación: 8 octubre 2002

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

**Análisis de variabilidad génica de *Trypanosoma cruzi*
aislado de triatominos de cinco áreas endémicas de Guatemala**



Lizeth Alejandra Castillo Alvarez

Guatemala

2002

PREFACIO

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la cual es una afección parasitaria y tisular transmitida a los mamíferos, incluyendo a los humanos, por hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae, y subfamilia Triatominae (Monteiro, *et al.*, 2001; Petana, 1979; WHO and TDR, 1991). La distribución geográfica del *T. cruzi* coincide con la del vector y abarca desde el sur de Estados Unidos de América hasta el sur de Argentina (INGEBI, 2001)

En un intento por caracterizar posibles grupos de aislados de *T. cruzi* presentes en áreas endémicas de Guatemala (Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Zacapa), se hizo un análisis de variabilidad genética en dichas áreas. Este análisis se basó en la amplificación, clonación y secuenciación de la región hipervariable del minicírculo del ADN cinetoplasto de los aislados de *T. cruzi*, en estadio epimastigote, obtenidos de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, especies de vectores más importantes en Guatemala.

Para llevar a cabo este estudio se requirió de la ayuda de varios colaboradores. Quisiera agradecer a: Dra. Pamela Pennington, por la luz que nace de tu calidad personal y profesional y que me permitió aprender que existen personas que buscan excelencia y la comparten, exhortándonos a seguir los mismos pasos. Por tus consejos, paciencia, dedicación, entusiasmo, y apoyo tanto en el ámbito profesional como personal; mis más sinceros agradecimientos. Dra. María Eugenia Morales por su apoyo y participación en la revisión y evaluación de la tesis, y su tiempo. Por su entusiasmo y apoyo en el ámbito profesional y personal. Licda. Celia Córdón por su apoyo en el análisis de datos y participación en la evaluación de la tesis. Licda. Margarita Palmieri por su apoyo en el préstamo de materiales de laboratorio. Licda. Renata de Cabrera por su comprensión,

su tiempo, sus comentarios y apoyo incondicional en la revisión de la tesis. Dr. Héctor Aguilar por su tiempo en la revisión de la tesis. Bernarda, Lolita, Edgar, Cynthia, y Pedro por el trabajo en equipo para la obtención de las muestras. Paola, Fredy, Carmen Lucía y otros amigos del laboratorio por su apoyo moral. Dr. Ben Beard por brindarme el apoyo para trabajar en su laboratorio del Centro de Control y Prevención de Enfermedades “Centers For Disease Control and Prevention” (CDC). Dr. Tovi Lehman por su apoyo en proveerme información para analizar los resultados. Andrew Hammond y Gena Groner por su apoyo en cuanto a la secuenciación de los clones de los aislados de *T. cruzi*.

Este estudio fue financiado por: el “fellowship award” del “European Community-Latin America Network for Research on the Biology and Control of Triatominae” (ECLAT) otorgado a Pamela Pennington y Celia Cerdón-Rosales, por el “fellowship award” de WHO-TDR otorgado a Pamela Pennington, por el “Memorial Institute of Trypanosoma-GORGAS Award” otorgado a Pamela Pennington, y por el Centro de Estudios de Salud de la Universidad del Valle de Guatemala.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a mis papás Guillermo y Ana Beatriz, y a mis hermanos: Guillermo Eduardo, Evelyn, y Cecilia por brindarme su constante apoyo, principalmente cuando mas los necesité. A mi demás familia por brindarme su apoyo moral. Y demás amigos y personas que de alguna forma contribuyeron a la realización del presente estudio. A todos gracias, y dedico con mucho cariño este estudio.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO	iv
LISTA DE CUADROS Y GRÁFICAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xix
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
A. Descripción general de la Enfermedad de Chagas	4
B. Parásito: <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	6
1. Ubicación sistemática	6
2. Morfología	6
3. Ciclo de vida	10
4. Organización y variabilidad génica de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	11
a. Descripción general del genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	11
b. Organización del cinetoplasto	11
c. Minicírculo	13
1) Función como ARN guía (gRNA)	13
2) Transcripción	18
3) Replicación	20
d. Diversidad génica	23
1) Generalidades sobre la diversidad génica de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	23
a) En el lenguaje de proteínas	23
b) En el lenguaje de ADN	24

2)	Cómo medir la diversidad génica de secuencias y cómo encontrar cuadros abiertos de lectura en secuencias	26
a)	Algoritmo de Higgins-Sharpe	27
b)	Método de distancia media o método de agrupación en parejas con media aritmética no ponderada, "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean" (UPGMA)	28
c)	Algoritmo de Lipman-Pearson	29
d)	Método de Fickett	29
e.	Estructura de la población y tipificación génica del <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	31
C.	Vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	36
1.	Distribución taxonómica de los vectores	36
2.	Distribución geográfica de los vectores	36
a.	<i>Triatoma dimidiata</i> (<i>T. dimidiata</i>)	37
1)	Habitat	39
2)	Distribución geográfica	40
b.	<i>Rhodnius prolixus</i> (<i>R. prolixus</i>)	41
1)	Habitat	42
2)	Distribución geográfica	43
3.	Nombres vulgares de los triatominos	43
D.	Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas	47
E.	Sintomatología de la Enfermedad de Chagas	47
F.	Transmisión de la Enfermedad de Chagas	51
G.	Tratamiento y control de la Enfermedad de Chagas	52
H.	Estudios de diversidad génica de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el lenguaje de ADN	54
1.	Análisis de esquizodemos de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) por medio de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable del minicírculo	54

2.	Análisis del ADN cinetoplasto (kDNA) utilizando la técnica de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciador específico de baja astringencia “low stringency specific primer PCR” (LSSP-PCR)	55
3.	Estudios de infecciones mixtas en <i>Triatoma infestans</i> (<i>T. infestans</i>) de Bolivia	56
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
A.	Hipótesis	57
B.	Objetivo general	57
C.	Objetivos específicos	57
IV.	MATERIALES Y METODOS	59
A.	Parásito e insectos	59
B.	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias hipervariables del minicírculo	62
C.	Preparación de células electrocompetentes XL1-Blue (Invitrogen)	63
D.	Clonación del fragmento de 330 pb de la región hipervariable del minicírculo	65
E.	Almacenamiento de células transformadas	66
F.	Conteo y selección de colonias	66
G.	Lisados de clones para amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
H.	Diseño de oligos para tamizaje	67
I.	Tamizaje de clones con los oligos “M13 Forward.1” (M13F.1) y “M13 Reverse” universal (M13R)	69

J.	Análisis por el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima de restricción RSA I (Promega (Madison, WI))	69
K.	Determinación de la secuencia de los fragmentos de ADN amplificados con los oligos "M13 Forward.1" (M13F.1) y "M13 Reverse" universal (M13R)	71
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
A.	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y desarrollo de la metodología para la clonación de la región hipervariable del minicírculo del ADN total, de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	73
B.	Secuencias de la regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de algunos de los clones obtenidos de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	77
C.	Análisis de la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo por el método de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y búsqueda de posibles sitios de restricción	84
	1. Desarrollo de metodología para la corrección del error de migración	84
	2. Identificación de patrones de restricción característicos o equizodemos de la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo amplificada y clonada	92
	3. Búsqueda de posibles sitios de restricción en la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo secuenciada	93
D.	Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables secuenciadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	97
	1. Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre cada aislado de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	98

2.	Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) del mismo departamento	117
3.	Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) de distintos departamentos	126
VI.	CONCLUSIONES	147
VII.	RECOMENDACIONES	149
VIII.	LITERATURA CITADA	151
IX.	APÉNDICES	159
	A. Glosario	159
	B. Estructura clonal de <i>Trypanosoma cruzi</i>	168
	C. Estimación de la masa molecular de bandas desconocidas obtenidas por RFLP	169
	D. Factor de corrección, F, para la masa molecular de las bandas desconocidas	170
	E. Identificación de posibles esquizodemos	171
	F. Distancias migradas de los estándares moleculares de 25 pb y de (100 + 25) pb utilizados para el análisis de esquizodemos de los distintos aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	172
	G. Ejemplo de análisis de migración en $\text{cm} \pm 0.05 \text{ cm}$ de los estándares internos de 25 pb y 100pb + 25 pb.	175
	H. Migración media en $\text{cm} \pm 0.05$ de los marcadores de masa molecular de 25 pb y 100pb + 25pb tomando en cuenta todas las geles de acrilamida analizadas.	176

I. Abreviaturas de aminoácidos

177

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICAS

Cuadro	Página
1. Subdivisiones génicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) propuestas anteriormente y las propuestas por Tibayrenc en 1998.	34
2. Sistemática de los triatomíneos que transmiten la Enfermedad de Chagas	37
3. Estimación de las tasas de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) al hombre expresadas en porcentajes de la incidencia total	52
4. Descripción de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) analizados	62
5. Estimación de la masa molecular de las diferentes bandas observadas en los patrones de restricción de los distintos clones de cada aislado de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) corregidas con el patrón interno de 143 pb	86
6. Análisis de restricción de los clones secuenciados con las enzimas de restricción RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII	93
7. Análisis de restricción con Sau3AI y AluI de los clones secuenciados que no presentan sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII	95
8. Contenido de nucleótidos, en porcentaje, de cada uno de los clones secuenciados de los distintos aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	99
9. Aislados agrupados por departamentos	117

10. Análisis de porcentaje de similitud de la región hipervariable del minicírculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) de la cepa Y Brazil con la de los clones secuenciados	136
11. Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético universal	139
12. Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético universal	140
13. Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos.	141
14. Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos	142
15. Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega) en las geles corridas para los aislados 4-25 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm \pm 0.05)	172
16. Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega) en las geles corridas para los aislados 27-68 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm \pm 0.05)	172
17. Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega) en la gel corrida para el aislado 72 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm \pm 0.05)	173
18. Distancias migradas del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega) en las geles corridas para los aislados 4-25 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm \pm 0.05)	173
19. Distancias migradas del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega) en las geles corridas para los aislados 27-68 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm \pm 0.05)	174

20.	Distancias migradas del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega) en la gel corrida para el aislado 72 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) (cm ± 0.05)	174
21.	Migración de los marcadores de masa molecular de la electroforesis corrida en una misma gel para los clones del aislado 4	175
22.	Migración media de los marcadores de masa molecular de 25 pb y (100 + 25) pb en 17 geles	176
23.	Abreviaturas de aminoácidos utilizando el código de una letra	177
Gráfica		Página
1.	Composición media de nucleótidos de la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo	100

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) en muestra de sangre	8
2. Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	8
3. Forma tripomastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) en sangre	9
4. Sección delgada de músculo cardíaco (tinción haematoxilina y eosina) mostrando la etapa amastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	9
5. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	10
6. ADN cinetoplasto y sus componentes	13
7. Representación esquemática de la organización de las regiones de un minicírculo y localización de los distintos orígenes de replicación	14
8. Modelo de acción de un ARN guía (gRNA) en el gene del citocromo <i>b</i> en <i>Leshmania</i> .	16
9. Mecanismo de rompimiento y ligación del ARN preeditado	17
10. Mecanismo de transesterificación para edición del ARN	18
11. Diagrama esquemático de minicírculos concatenados y libres	22
12. Distribución geográfica de los triatomíneos selváticos y domésticos causantes de la Enfermedad de Chagas	38

13.	<i>Triatoma dimidiata</i> (<i>T. dimidiata</i>)	38
14.	Guatemala: tipo de casa propicia a infestación por triatominos	39
15.	Distribución geográfica mundial de <i>Triatoma dimidiata</i> (<i>T. dimidiata</i>)	42
16.	Distribución geográfica de <i>Triatoma dimidiata</i> (<i>T. dimidiata</i>) y <i>Rhodnius prolixus</i> (<i>R. prolixus</i>) en Guatemala	44
17.	<i>Rhodnius prolixus</i> (<i>R. prolixus</i>) adulta comiendo sangre a través de piel humana.	45
18.	Distribución geográfica mundial de <i>Rhodnius prolixus</i> (<i>R. prolixus</i>)	45
19.	Distribución geográfica de <i>Rhodnius prolixus</i> (<i>R. prolixus</i>) en Guatemala	46
20.	Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas en departamentos endémicos de Guatemala	49
21.	Fase aguda de la Enfermedad de Chagas en una niña de Sao Felipe, Brazil	50
22.	Ilustración necrótica de cardiopatía de Chagas	50
23.	Departamentos endémicos con la Enfermedad de Chagas en Guatemala	60
24.	Distribución de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) analizados en los departamentos endémicos de Guatemala	61
25.	Diagrama de localización de óligos “M13Forward.1” (M13F.1) y “M13Reverse” universal (M13R)	68

26.	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos de 780 pb y 330 pb utilizando el par de iniciadores S35 y S36	74
27.	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento de 330 pb perteneciente a la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo de algunos de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	74
28.	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento de 596 pb con los cebadores “M13Forward.1” (M13F.1) y “M13Reverse” (M13R) de los clones seleccionados	76
29.	Variación en la migración del control interno de 143 pb dentro de una misma gel, como ejemplo de la migración no lineal para fragmentos menores de 200 pb	86
30.	Diagramas de los sitios de restricción para las enzimas <i>RsaI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>TaqI</i> , <i>HinfI</i> , y <i>AluI</i> en algunos clones secuenciados	95
31.	Alineación de secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los clones de un mismo aislado, así como su diagrama de similitud	101
32.	Alineación de secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los clones, organizadas por departamento, así como su diagrama de similitud	118
33.	Alineación de secuencias de la región hipervariable del minicírculo de los clones de los aislados de Jalapa con los clones de los aislados de los distintos departamentos endémicos, así como su diagrama de similitud	127
34.	Alineación de secuencias, por el método de Higgins-Sharpe, de las regiones hipervariables del minicírculo de un clon de cada departamento con la secuencia de la cepa Y de Brazil, así como su diagrama de similitud	135

35. Fragmento de secuencia de 49 pb de la región variable del minicírculo que puede servir como templado para ARN guía de la subunidad 6 de la ATPasa en <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>)	137
36. Traducción de la región variable del minicírculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>) del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' y 5'-3'	138
37. Diagrama de los cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético universal	139
38. Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético universal	140
39. Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos	141
40. Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos	142
41. Alineación de la región de 70-220 pb de las regiones hipervariables del minicírculo entre un clon de cada departamento con la secuencia de la cepa Y de Brazil, así como su diagrama de similitud, por el método de Higgins-Sharpe	143
42. Modelo Histotrópico clonal de la Enfermedad de Chagas	168

RESUMEN

El presente estudio trata sobre la variabilidad génica de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente causante de la tripanosomiasis americana, en áreas endémicas de Guatemala. Esta variabilidad génica se determinó con base en la amplificación, clonación y determinación de secuencia de la región hipervariable del minicírculo del ácido desoxirribonucleico (ADN) cinetoplasto, entre aislados de *T. cruzi* en estadio epimastigote, obtenidos de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Las áreas endémicas estudiadas fueron: Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Zacapa; y la población total de aislados de *T. cruzi* fue 17.

Dicho estudio está comprendido en dos partes principales:

- i) Análisis de la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo por el método de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y búsqueda de posibles sitios de restricción.
- ii) Determinación de la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo del kDNA de los aislados de *T. cruzi*.

En la primera parte, se desarrolló una metodología para la corrección del error de migración de fragmentos de ADN en geles de acrilamida. Posteriormente, se hizo la identificación de posibles patrones de restricción característicos de la región hipervariable del kDNA del minicírculo amplificada y clonada, utilizando la enzima de restricción RsaI. Por último, en las secuencias de las regiones hipervariables clonadas se buscaron posibles sitios de restricción para las enzimas RsaI, HinfI, TaqI, HaeIII, y AluI.

En la segunda parte del estudio, para poder determinar la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables amplificadas y clonadas se compararon los clones de la siguiente manera:

- i) **Entre cada aislado** de *T. cruzi*.
- ii) **Entre aislados** de *T. cruzi* **del mismo departamento**.
- iii) **Entre aislados** de *T. cruzi* **de distintos departamentos**.

En éste último punto se incluyó el análisis con la secuencia de la cepa Y Brazil de *T. cruzi* (No. de acceso 18814 en GeneBank™).

Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que la región conservada del kADN del minicírculo se mantiene entre distintos aislados de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos con RFLP y con el análisis de secuencias sugieren que no hay recombinación dentro y entre los minicírculos de *T. cruzi*, apoyando, entonces, la teoría sobre la estructura clonal del parásito. En cuanto a la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables amplificadas, y clonadas, se concluyó que dichas regiones tienen una similitud entre el 20% y 35% según el algoritmo de Higgins-Sharpe, y una similitud del 60% con el algoritmo de Lipman-Pearson. Paralelamente, se determinó la presencia de posibles cuadros abiertos de lectura para la región hipervariable del minicírculo, utilizando el código genético universal y el código genético mitocondrial de protozoos, los cuales, sugieren que la región variable puede ser transcrita.

En resumen, todos los resultados sugieren que la región variable del kDNA del minicírculo no es un buen marcador para determinar la variabilidad de los aislados de *T. cruzi*.

I. INTRODUCCIÓN

Existen casos de la Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, solamente en América, y su agente causante es el protozoo kinetoplástido *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La Enfermedad de Chagas es una afección parasitaria y tisular transmitida a los mamíferos, incluyendo a los humanos, por hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae, y subfamilia Triatominae (Monteiro, *et al.*, 2001; Petana, 1979; WHO, 1991). La distribución geográfica del *T. cruzi* coincide con la del vector y abarca desde el sur de Estados Unidos de América hasta el sur de Argentina (INGEBI, 2001). Específicamente, en Guatemala las dos especies de vectores más importantes son *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*) y *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*).

Hoy en día, el Ministerio de Salud Pública de Guatemala, así como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de Salud (OPS), la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), entre otros, están haciendo un esfuerzo en conjunto para controlar y prevenir la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. En Guatemala existe una seroprevalencia del mal de Chagas, en niños de edad escolar en áreas endémicas, de hasta 15%, y actualmente no existe algún estudio publicado sobre la variabilidad génica de aislados de *T. cruzi*. La importancia de la determinación de la variabilidad génica tanto del parásito como del vector recae en el entendimiento de la epidemiología molecular de la enfermedad. Esta epidemiología podría correlacionarse con el diagnóstico clínico y con el control de transmisión de la enfermedad.

En cuanto a la descripción del genoma de los *Trypanosomas spp.* se sabe que son unos de los primeros eucariotas en tener mitocondria, y una de las características que los distingue es el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, conocido como ADN cinetoplasto o “kinetoplastid DNA” (kDNA). El kDNA es una red de moléculas concatenadas compuesta por dos poblaciones discernibles de ADN circular: maxicírculos, y minicírculos. Para efectos de este estudio se analizó solamente el minicírculo de *T. cruzi*. Cada minicírculo de *T. cruzi* está organizado en cuatro regiones conservadas repetitivas

de 120 pares de base (pb), y en cuatro regiones hipervariables no repetitivas de aproximadamente 330 pb.

En estudios anteriores mencionados por Macedo, *et al.* (1998) sobre el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción, “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP), del kDNA de *T. cruzi*, se demostró que la región hipervariable del kDNA del minicírculo evoluciona lo suficientemente rápido como para producir diferencias entre distintos aislados, pero no tan rápido como para excluir la identidad genética estable de la cepa, sugiriendo que el minicírculo es un buen marcador molecular para clasificar dicho parásito. Razón por la cual en el presente estudio, análisis de variabilidad génica de *T. cruzi*, se utilizó la región hipervariable del minicírculo como marcador molecular.

El estudio se dividió en dos partes principales:

- i) Análisis de la región hipervariable del kDNA del minicírculo por el método de RFLP y búsqueda de posibles sitios de restricción.
- ii) Determinación de la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo del kDNA de los aislados de *T. cruzi*.

En la primera parte, se desarrolló una metodología para la corrección del error de migración de fragmentos de ADN en geles de acrilamida. Posteriormente, se hizo la identificación de posibles patrones de restricción característicos de la región hipervariable del kDNA del minicírculo amplificada y clonada, utilizando la enzima de restricción *RsaI*. Por último, en las secuencias de las regiones hipervariables clonadas se buscaron posibles sitios de restricción para las enzimas *RsaI*, *HinfI*, *TaqI*, *HaeIII*, y *AluI*.

En la segunda parte del estudio, para poder determinar la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables amplificadas y clonadas se compararon los clones de la siguiente manera:

- i) **Entre cada aislado de *T. cruzi*.**
- ii) **Entre aislados de *T. cruzi* del mismo departamento.**
- iii) **Entre aislados de *T. cruzi* de distintos departamentos.**

En este último punto se incluyó el análisis con la secuencia de la cepa Y Brazil de *T. cruzi* (No. de acceso 18814 en GeneBank™). Las comparaciones de secuencias se hicieron por alineación múltiple (con el algoritmo de Higgins-Sharpe) y con alineación por parejas (con el algoritmo de Lipman-Pearson).

Los resultados obtenidos con RFLP y con el análisis de secuencias sugieren que no hay recombinación dentro y entre los minicírculos de *T. cruzi*, apoyando, entonces, la teoría sobre la estructura clonal del parásito. En cuanto a la variabilidad génica entre las regiones hipervariables amplificadas, clonadas y secuenciadas, se concluyó que dichas regiones tienen una similitud entre el 20% y 35% según el algoritmo de Higgins-Sharpe, y una similitud del 60% con el algoritmo de Lipman-Pearson. Paralelamente, se determinó la presencia de posibles cuadros abiertos de lectura para la región hipervariable del minicírculo, utilizando el código genético universal y el código genético mitocondrial de protozoos, los cuales, sugieren que la región variable puede ser transcrita. Por último, contrario a lo mencionado por Macedo, *et al.* (1998) los resultados sugieren que la región variable del kDNA del minicírculo no es un buen marcador para determinar la variabilidad de los aislados de *T. cruzi*.

II. ANTECEDENTES

A. Descripción general de la Enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente causante de la Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la cual es una afección parasitaria y tisular transmitida a los mamíferos, incluyendo a los humanos, por hemípteros hematófagos obligados de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Monteiro, *et al.*, 2001; Petana, 1979; WHO and TDR, 1991). Sólomente en América existen casos de la Enfermedad de Chagas, y fue descubierta en 1909 cuando Carlos Chagas observó por primera vez en extendidos de sangre periférica un parásito flagelado y describió la enfermedad causada por *Schizotrypanum cruzi*. Esta es la única enfermedad tropical en la cual el agente etiológico fue descrito primero en el vector. Carlos Chagas determinó el ciclo de vida del hemoparásito e identificó al insecto vector como perteneciente a la familia Reduviidae. Sus estudios establecieron que los roedores actuaban como reservorios y una de sus contribuciones más relevantes fue un estudio sobre la profilaxis de la infección (Carrasco, 1996). La existencia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala fue descubierta por primera vez por el Dr. J. Romeo De León a principios del año de 1932 y confirmada por los trabajos del Dr. Reichenow a fines de ese mismo año (Montenegro, 1943).

Ordinariamente, el *T. cruzi* se transmite al hombre en las deyecciones de sus vectores, las chinches triatominas, y no en la picadura de éstas. No hay transmisión transovárica de *T. cruzi*, es decir, que no se transmite desde la chinche infectada hasta su cría. Las chinches pueden contraer la infección alimentándose de un mamífero infectado; y en condiciones experimentales también pueden contraer la infección ingiriendo deyecciones infectadas de otra chinche (coprofagia) o chupando sangre infectada directamente de una chinche recién alimentada (canibalismo). La infección de la chinche dura toda la vida. Por esa razón, las tasas de infección tienen tendencia a aumentar con la edad de la chinche y su estadio de desarrollo. A menudo, la tasa de infección entre chinches adultas excede el 50%. Los parásitos en el intestino de la chinche pueden sobrevivir durante varios días después de la muerte de la chinche. (Schofield, 1994)

La Enfermedad de Chagas es un problema grave de salud pública en las Américas. Las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a principios de 1990 indicaban que entre 16 y 18 millones de personas estaban infectadas con *T. cruzi*, con otras 100 millones en riesgo. Sin embargo, el número de personas infectadas ha disminuído a 12 millones como resultado de intensas intervenciones de control. La infección puede ser mortal, y a menudo conduce a lesiones muy debilitantes de los órganos vitales, especialmente el corazón y el tracto intestinal. Además, ya que la infección es incurable, salvo durante las primeras fases, y hoy en día aún no hay vacunas, el control depende mucho de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos vectores. (Monteiro, *et al.*, 2001; Schofield, 1994)

La Enfermedad de Chagas tiene gran impacto social y económico. Tener serología positiva, pero sin la posibilidad de un tratamiento eficaz, puede ser muy angustiante, incluso en ausencia de síntomas evidentes. A veces se deniega el empleo a las personas que tengan la serología positiva, debido al pronóstico desfavorable de los infectados y en parte con motivo de un temor infundado a la infección. No se ha hecho ninguna estimación directa del absentismo o la pérdida de productividad laboral debido a la Enfermedad de Chagas pero los estudios experimentales demuestran que la capacidad de trabajo manual puede resultar gravemente comprometida durante la fase crónica de la enfermedad. Con base en la población total en riesgo e infectada con la Enfermedad de Chagas, en 1993, las estimaciones del Banco Mundial sitúa dicha enfermedad en tercer lugar entre las causas más importantes de discapacidad atribuible a las enfermedades parasíticas (después de la malaria y esquistosomiasis). Para Latinoamérica, la enfermedad actualmente se encuentra en cuarto lugar de importancia por discapacidad, después de enfermedades respiratorias, diarreas y SIDA. (Schofield, 1994)

Durante muchos años, la Enfermedad de Chagas fue considerada como una infección propia de los países cálidos, pero puede encontrarse en climas templados y algunas regiones consideradas frías. En general, las infecciones agudas se presentan con más frecuencia durante la primavera y el verano, es decir cuando los triatominos tienen su mayor actividad biológica natural. (Goldsmith, 1978)

B. Parásito: *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

1. Ubicación sistemática

Reino:	Protista
Phylum:	Sarcomastigophora
Subphylum:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophorea
Orden:	Kinetoplastida
Suborden:	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i>
Especie:	<i>cruzi</i>

(INGEBI, 2001)

2. Morfología

El *T. cruzi* (*vid* figura 1) presenta tres estadios, distinguibles según las características del flagelo y la posición relativa del cinetoplasto respecto al núcleo celular. (INGEBI, 2001)

a. Epimastigote (*vid* figura 2). Es la forma flagelada replicativa en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el cinetoplasto es anterior al núcleo celular (INGEBI, 2001). El desarrollo de *T. cruzi* en el intestino de los triatomíneos depende de muchos factores que sólo hoy están elucidándose. En general, el parásito parece hacer poco daño a sus vectores insectílicos, aunque existen pruebas de un efecto supresivo sobre el sistema inmunitario hemocélico y de una reducción de la supervivencia de las chinches infectadas sometidas a un segundo factor de estrés, como por ejemplo el ayuno o dosis subletales de insecticidas (Schofield, 1994).

b. Tripomastigote (*vid* figura 3). Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospederos. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el cinetoplasto es posterior al núcleo celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos por un evento fagocítico y otros tipos celulares, por un evento dirigido por el parásito y mediado por receptores. (INGEBI, 2001)

c. Amastigote (*vid* figura 4). Es la forma no flagelada de localización intracelular en vacuolas ácidas y replicativa en el citoplasma de las células del hospedero vertebrado. (INGEBI, 2001)

Figura 1
Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) en muestra de sangre.
Tinción Giemsa
(CDC, 2001)

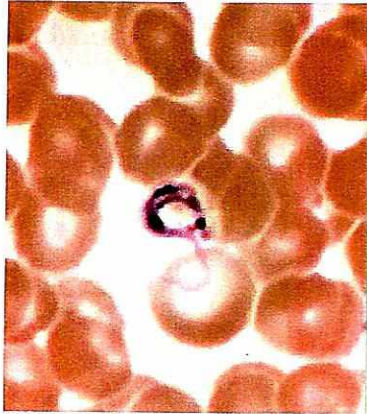


Figura 2
Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)
(WHO and TDR, 1989)

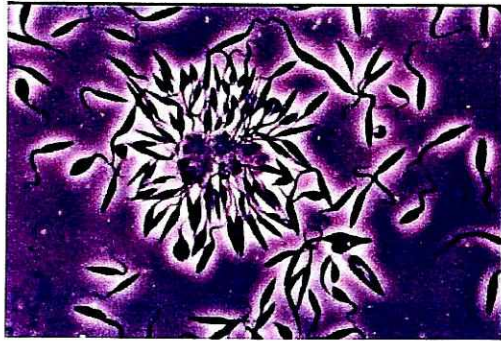


Figura 3
Forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en sangre
(WHO and TDR, 1991)

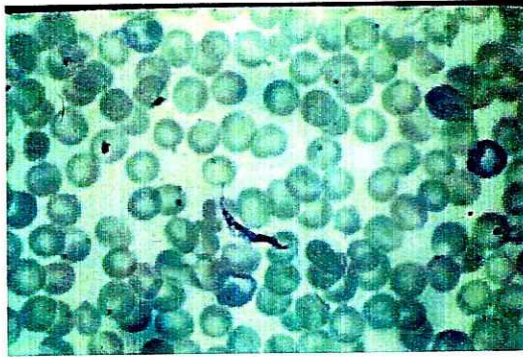
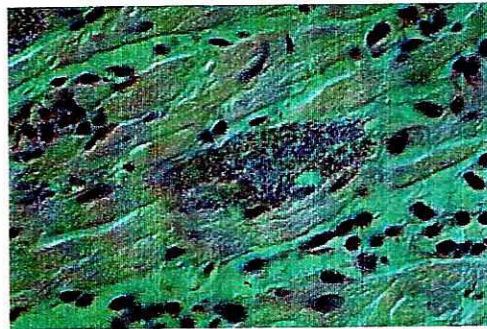


Figura 4
Sección delgada de músculo cardíaco (tinción haematoxilina y eosina)
mostrando la etapa amastigote de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).
Los amastigotes se multiplican, destruyendo tejido adjunto, y forma pseudoquísticas.
(WHO, *et al.*, 2000)



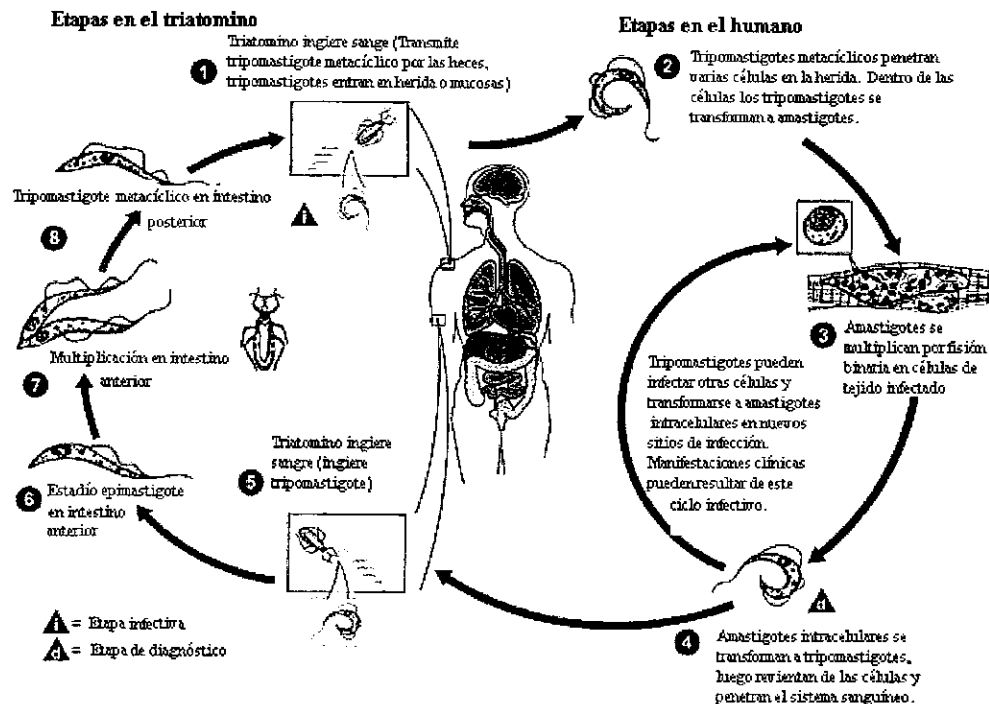
3. Ciclo de Vida

El *T. cruzi* se reproduce por fisión binaria, y su ciclo de vida involucra el desarrollo en dos tipos de hospederos:

a. Hospedero vertebrado. Más de cien especies de mamíferos, incluyendo el hombre, animales domésticos, y reservorios silvestres pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Edenata, Rodentia, Carnívora, Lagomorpha, Artiodáctila, Chiróptera y Primata. (INGEBI, 2001)

b. Hospedero invertebrado. Más de 80 especies de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Los géneros *Pastrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* son los más frecuentes. Dado que los triatominos suelen picar en el rostro, se les ha denominado barberos. (INGEBI, 2001)

Figura 5
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)
(CDC, 2002)



4. Organización y variabilidad génica de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

a. Descripción general del genoma de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

Anteriormente, el genoma de *T. cruzi* se había considerado que era haploide (Carrasco, 1996) pero hoy en día, con base en estudios con microsatélites, se ha propuesto que el genoma es diploide (Oliveira, *et al.*, 1998). El tamaño del genoma de *T. cruzi* es de aproximadamente 10^8 pb, y esta estimación está basada en técnicas de renaturalización de ADN. Debido a la falta de condensación de los cromosomas en los tripanosomátidos, la cariotipificación se ha realizado mediante electroforesis en campo pulsante "Pulse Field Electrophoresis" para separar fragmentos de ADN de gran tamaño. Por éste método se ha observado que *T. cruzi* tiene aproximadamente entre 40 a 64 cromosomas, y no se ha demostrado la existencia de minicromosomas.

En el estudio realizado en 1992 por Wagner y So se identificó un elemento extracromosomal de 75 kb, denominado ADN extracromosomal largo "Large Extrachromosomal DNA, LED" (Wagner y So, 1992). El LED contiene una secuencia satélite en el ADN genómico, que sugiere que el parásito puede experimentar una alta frecuencia de reorganización genética resultando en un aumento de heterogeneidad (Carrasco, 1996).

b. Organización del cinetoplasto

Los protozoos tripanosomátidos son los causantes de varias enfermedades tropicales. Éstos pertenecen al orden cinetoplástida, e incluyen a *trypanosomas*, *leishmanias*, *leptomonas*, *fitomonas*, *herpetomonas* y *critidias*. Los tripanosomátidos constituyen unos de los primeros eucariotas en tener mitocondria, y una

de las características que los distingue es el ADN mitocondrial, conocido como ADN cinetoplasto (kDNA) (Englund, *et al.*, 1996).

El kDNA es una red de moléculas concatenadas con una estructura discoide (*vid* figura 6). En el *T. cruzi* el kDNA constituye el 20% del ADN de la célula y está compuesto por dos poblaciones discernibles de ADN circular:

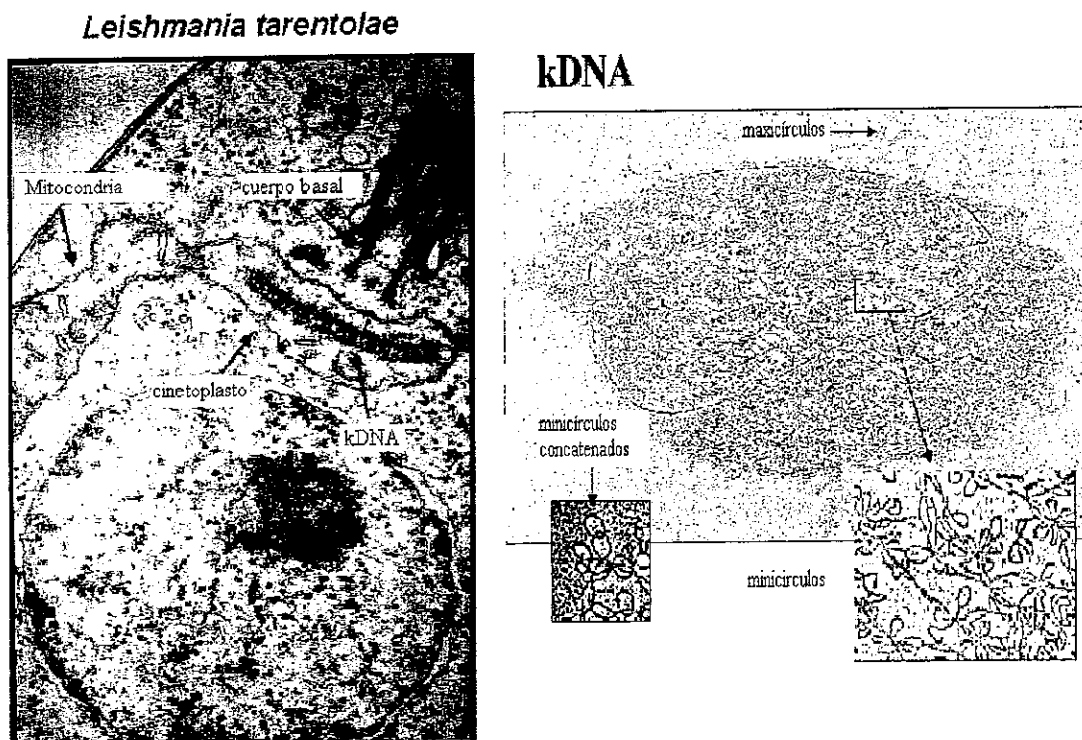
- i) El maxicírculo, que contiene genes codificantes para proteínas ribosómicas y enzimas mitocondriales; tiene un tamaño que oscila entre 20 a 38 kilobases (kb), y la cantidad que hay es de 20 a 50 copias/célula.
- ii) El minicírculo (que es el componente principal de la red), codifica ácido ribonucleicos (ARN) guías “small RNA guide transcripts” (gRNA), que editan los transcritos de los maxicírculos (Sturm, *et al.*, 1989) para formar cuadros abiertos de lectura “Open Reading Frames” (ORF) funcionales. A dicho proceso de modificación se le denomina edición del ARN, ya que implica la adición u omisión de uridinas en dirección 3’ a 5’ para generar mensajeros traducibles (Carrasco, 1996; Morris, *et al.*; 2001). Posteriormente se profundizará dicho tema.

Actualmente se ha encontrado que el minicírculo no sólo está involucrado en la segregación de maxicírculos, sino que existe evidencia directa de que el minicírculo es transcrito, lo cual se detallará en el siguiente punto. El tamaño del minicírculo es de aproximadamente 1.42 kb y en cantidad hay entre 5,000 a 20,000 por célula (Sturm, *et al.*, 1989). En general, para los tripanosomátidos, el número de estos minicírculos varía entre 6,000 y 30,000, y son altamente variables, pero suelen presentar zonas conservadas que posiblemente están asociadas a la replicación (Alves, *et al.*, 1994; Carrasco, 1996; Venegas, *et al.*, 1997).

Los minicírculos, contenidos en las células de *T. cruzi*, consisten en varias clases de secuencia múltiple, cuyo número y frecuencia exactos aún son inciertos. Cada minicírculo está organizado en:

- i) Cuatro miniregiones conservadas repetitivas de 120 pb situadas a intervalos de 90°.
- ii) Y en cuatro regiones hipervariables no repetitivas de aproximadamente 330 pb. (vid figura 7). (Sturm, *et al.*, 1989)

Figura 6
ADN cinetoplasto y sus componentes
(UCLA, 2002)



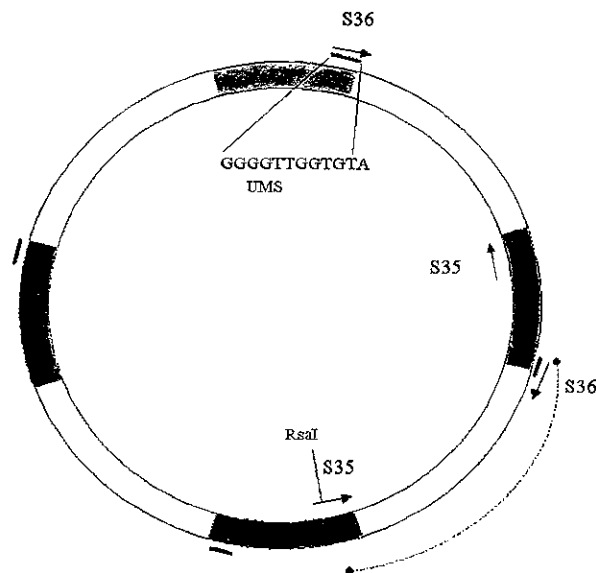
c. Minicirculo

1) Función como ARN guía (gRNA)

Como se había mencionando anteriormente, una de las funciones del minicirculo es proveer gARN para editar los ARN mensajeros (mARN) provenientes de los maxicirculos. Un gARN contiene la secuencia que es complementaria a la secuencia de mARN correctamente editada. La figura 8 muestra un

modelo de ARN en el gene del citocromo *b* en *Leishmania*. La secuencia de arriba muestra el transcrito original, o ARN preeditado. Los espacios denotan dónde serán insertadas las bases en el proceso de edición. En este caso se deben insertar un total de ocho uridinas para crear la secuencia de mRNA válida. (Lewin, 2000)

Figura 7
Representación esquemática de la organización
de las regiones de un minicírculo y localización de los distintos orígenes de replicación
(Sturm, *et al.*, 1989)



- Minirregiones conservadas repetitivas de 120 pb
- Regiones variables no repetitivas de aproximadamente 330 pb incluyendo los oligonucleótidos cebadores S35/S36
- Cuatro orígenes de replicación comprendidos en parte por la secuencia universal del minicírculo
- UMS Secuencia universal del minicírculo. El iniciador S36 contiene parte de la UMS
- Sitio de restricción para la enzima RsaI en oligonucleótido degenerado S35

Siguiendo con el ejemplo de *Leishmania*, se observa en la figura 8 que el gARN es complementario al mRNA por una distancia significativa tanto en la región editada como en sus alrededores. Usualmente, la complementaridad es mayor en el extremo 3' de la región editada y es más corta en el extremo 5'. La unión entre la secuencia del gARN

con la del ARN preeditado deja espacios donde los residuos de A no acoplados del gARN no tienen complemento en el ARN preeditado. Por lo tanto, el gARN sirve como templado para permitir la inserción de uridinas en esos espacios. Cuando la reacción es completada, el gARN se separa del mARN, el cual está listo para la traducción. (Lewin, 2000)

En general, la caracterización de intermediarios que son parcialmente editados sugiere que la reacción procede a lo largo de la secuencia de ARN preeditada en la orientación 3' a 5'. El gARN dictamina la especificidad de inserción u omisión de uridinas al ser unida con el ARN preeditado. (Lewin, 2000)

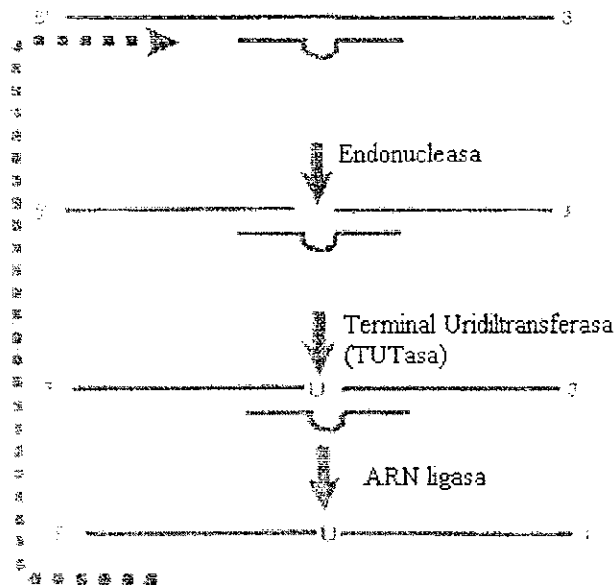
Los gARN varían en longitud desde 35 hasta 78 nucleótidos, lo que correlaciona con la variación de longitud de tres regiones funcionalmente importantes de los que están compuestos los gARN:

- i) Presencia de una secuencia de anclaje de 4 a 14 nucleótidos localizada en la región 5', la cual es complementaria a una secuencia blanco río abajo de un dominio de edición del ARN preeditado.
- ii) Una secuencia media que contiene la información de edición, la cual varía desde guiar la inserción de solamente un sitio hasta la inserción de 32 uridinas en 10 sitios.
- iii) Una extensión de 5 a 24 uridilos localizados en el extremo 3' terminal. La comparación de distintos gARN ha demostrado que además de la cola U 3' terminal, no hay motivos primarios o secundarios, sino que cada secuencia particular es única. (Benne, 1992)

El mecanismo bioquímico exacto de edición de ARN no se conoce aún, pero existen tres hipótesis:

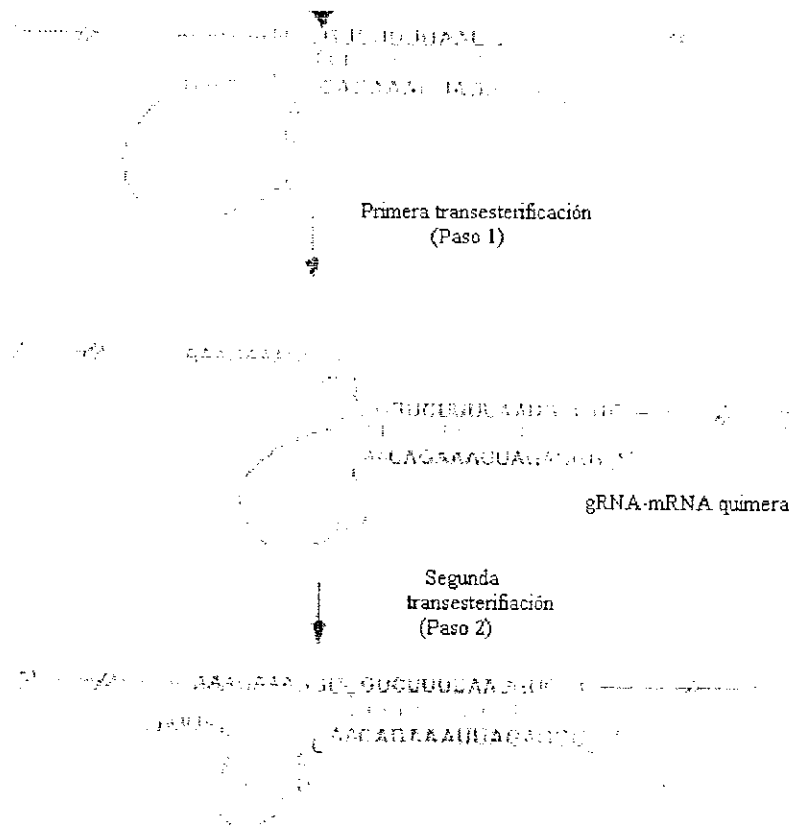
- i) Mecanismo de rompimiento y ligación. La edición de uridinas es catalizada por el complejo enzimático 20S que contiene una endonucleasa, una uridiltransferasa terminal (TUTasa) "terminal uridyltransferase", y una ARN ligasa (*vid* figura 9). La endonucleasa corta el ARN preeditado en el sitio identificado por la ausencia de unión con el gARN. Las uridinas son insertadas por la TUTasa, utilizando UTP como

Figura 9
Mecanismo de rompimiento y ligación del ARN preeditado
(Lewin, 2000)



- ii) Mecanismo de transesterificación. El hidroxilo 3' de la cola U del ARN guía ataca el enlace fosfodiéster del sitio de edición resultando en la formación de la molécula quimérica mARN preeditado ARNgúa. La quimera es resuelta por una reacción de transesterificación del hidroxilo 3' con el extremo 5' del producto cortado atacando dentro de la cola de U's del ARN guía (*vid* figura 10).
- iii) Mecanismo de adición por la TUTasa. Este mecanismo es el menos favorable, involucra la adición de residuos de uridina directamente en el mARN por la acción mitocondrial de la TUTasa. En esta reacción, el mARN preeditado es cortado por una ribonucleasa de edición sitioespecífica y las uridinas son añadidas al extremo 5' del producto cortado del mARN preeditado por la TUTasa (Hajduk, S, 1996).

Figura 10
Mecanismo de transesterificación para edición del ARN
(Hajduk, S, 1996)



2) Transcripción

Como se había mencionado anteriormente, el kDNA de los tripanosomas está compuesto por miles de minicírculos y unos cuantos maxicírculos, ambos concatenados formando una red grande. La transcripción de los maxicírculos ha sido extensamente estudiada, y está claro que el maxicírculo codifica varias proteínas internas de membrana mitocondrial necesarias para la respiración mitocondrial y los ARN ribosomales mitocondriales 9S y 12S. Sin embargo, la transcripción del maxicírculo es no convencional en tres aspectos. La transcripción de algunos genes del maxicírculo es regulada en el desarrollo, el marco de lectura de la citocromo oxidasa II se establece por un proceso único de edición de ARN, y los genes del ARN de transcripción (tARN) no han sido identificados aún en la porción del maxicírculo secuenciada. (Pietrzak, *et al.*, 1987)

Por otro lado, la función de los minicírculos está menos clara. La mayoría de los estudios realizados sugieren que los minicírculos tienen una función estructural en la mitocondria de los tripanosomas, al actuar como andamio para los maxicírculos. Se ha sugerido que, al formar la red de ADN, los minicírculos están involucrados en la segregación de maxicírculos durante la división mitocondrial o, alternativamente, en la regulación de la transcripción de minicírculos. Sin embargo, se había argumentado que los minicírculos tienen también una función codificadora, basado en evidencias indirectas. Primero, los minicírculos de la mayoría de tripanosomas son heterogéneos en secuencia. Segundo, con la excepción de la región conservada de 122 bp, las secuencias de los minicírculos evolucionan rápidamente. Tercero, las secuencias hipervariables de los minicírculos contienen varios codones de terminación.

No obstante, hoy en día existe evidencia directa de la transcripción de los minicírculos, en este caso estudiada en *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) por Pietrzak, *et al*, 1987. El estudio de dichos investigadores provee cinco formas distintas de probar la existencia de los transcritos de los minicírculos *in vivo* e *in vitro*, mas no de la traducción ni de la función de los mismos. Primero, con la utilización de sondas de ARN celular marcado lograron detectar transcritos del minicírculo por “Southern blots”. Segundo, al utilizar sondas de ADN del minicírculo marcadas lograron detectar el transcrito por “Northern blots”. Por hibridización del ARN celular total, con sondas marcadas de ARN hebra específica, seguido por digestión con la S1 nucleasa detectaron el transcrito del minicírculo protegido. Al utilizar ARN mitocondrial marcado por pulso o “pulse labeled” como sonda se detectó el transcrito del minicírculo en “Southern blots”. Finalmente, al aislar el ADN copia (cDNA) del minicírculo se demostró la presencia inicial del transcrito del minicírculo en la preparación de ARN obtenido por dichos investigadores. (Pietrzak, *et al.*, 1987)

La secuencia del cDNA del minicírculo revela varias características relevantes en la síntesis y función del transcrito. El cDNA del minicírculo contiene varios ORF cortos (varían de 72 pb a 108 pb), de los cuales uno comienza con un codón de metionina. La secuencia de aminoácidos predicha, de los polipéptidos codificados por los ORF, es rica

en residuos básicos (21% a 37%), lo cual sugiere que si estos ORF son traducidos la proteína obtenida puede que tenga actividad de unión de ADN análoga a las proteínas nucleares básicas (e.g. histonas) en otros eucariotas. Sin embargo, como se dijo anteriormente, este estudio realizado por Pietrzak y sus colaboradores no muestran evidencia directa de la traducción del transcrito del minicírculo así como tampoco de la función del mismo, pero proponen una posible función del transcrito del minicírculo como ARN estructural, de manera que permita la formación de la estructura secundaria del ARN. (Pietrzak, *et al.*, 1987)

3) Replicación

Tanto la replicación del minicírculo como la replicación del kDNA ha sido estudiada principalmente en *Chritidia fasciculata* (*C. fasciculata*), que es un modelo aplicable a los tripanosomátidos. Para empezar hay dos eventos que deben suceder durante la replicación del kDNA:

- i) El contenido de ADN de la red debe ser el doble durante cada generación.
- ii) Las dos redes de la progenie deben dividirse entre las dos células hijas durante la división celular. (Klinbeil, *et al.*, 2001)

En estudios iniciales, realizados hace más de 30 años, surgieron dos aspectos importantes en cuanto a la replicación del kDNA. Primero, la replicación del kDNA sucede aproximadamente en sincronización con la síntesis de ADN nuclear, a diferencia de otras especies donde la replicación del ADN mitocondrial sucede durante el ciclo celular. Segundo, cada minicírculo se replica una vez por generación, al igual que sucede con los maxicírculos. Estos descubrimientos fueron la base para estudiar el mecanismo de replicación del kDNA a nivel molecular y, por ende, la replicación del minicírculo. (Klinbeil, *et al.*, 2001)

En cuanto al minicírculo, parte de su origen de replicación (sitio de iniciación para la síntesis de la hebra líder) es una secuencia de 12 nucleótidos conocida como la secuencia

universal del minicírculo “Universal Minicircle Sequence” (UMS) (*vid* figura 7). Esta secuencia es la siguiente: 5'GGGGTTGGTGTA 3' y es universal porque se encuentra, virtualmente sin ninguna variación, en los minicírculos de todas las especies de tripanosomátidos estudiados (Morris, *et al.*, 2001; Gharaibeh, *et al.*; 2000). El *T. cruzi* contiene cuatro UMS localizados en las cuatro regiones conservadas.

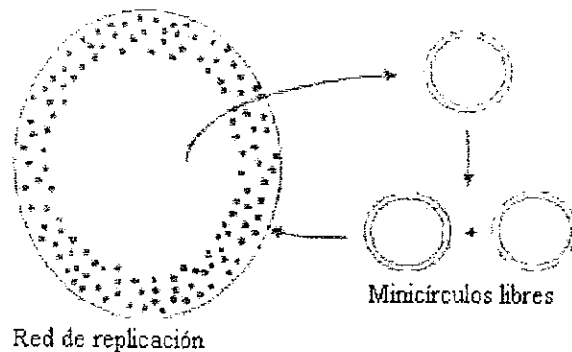
Anteriormente, ya se ha logrado purificar una proteína de unión, que es un homodímero de 13.7 kDa, de la UMS (UMSBP) de *C. fasciculata*. La UMSBP se une a fragmentos de ADN que contienen una secuencia de seis nucleótidos localizada aproximadamente a 80 nucleótidos del UMS que sirve como sitio de iniciación para el primer fragmento de Okasaki. Esta proteína de reconocimiento de origen, que juega un papel importante en la iniciación de la replicación del minicírculo, no se une a oligonucleótidos de doble hebra que contengan la secuencia UMS dodecamérica o hexamérica, aunque se una fuerte y específicamente a estas secuencias en su forma de hebra simple. Sin embargo, se une a estas secuencias de doble hebra en minicírculos libres covalentemente cerrados e intactos. Aparentemente, la secuencia del minicírculo dictamina la deformación estructural en la región de origen que permite la unión. (Morris, *et al.*, 2001)

El estudio de intermediarios en la replicación del minicírculo en *C. fasciculata* ha señalado aspectos importantes en el mecanismo de replicación:

- i) La replicación ocurre durante una fase discreta del ciclo celular, cercanamente concurrente con la fase nuclear S.
- ii) Antes de la replicación los minicírculos están covalentemente cerrados y, después de la replicación, están espaciados. La presencia de espacios puede ayudar a distinguir los minicírculos acabados de replicar, de los minicírculos aún no replicados, asegurándose de que cada minicírculo sólo se replique una vez, por ciclo celular.
- iii) Los minicírculos no se replican mientras están concatenados en la red, pero en cambio estos son liberados individualmente de la red, asumiéndose que actúa una topoisomerasa II, cuya función es catalizar la concatenación.

- iv) Los minicírculos libres covalentemente cerrados se replican unidireccionalmente como estructuras θ , formando progenie espaciada.
- v) La reconcatenación de los minicírculos libres replicados espaciados sucede en la periferia de la red. Esta especificidad de la reconcatenación de los minicírculos libres conlleva al desarrollo de dos zonas en la red de replicación: una zona periférica de minicírculos espaciados acabados de replicar y una zona central de minicírculos covalentemente cerrados. Conforme la replicación procede, la zona periférica de los minicírculos aumenta y la zona central de minicírculos covalentemente cerrados disminuye (*vid* figura 11).
- vi) Una vez todos los minicírculos hayan sido replicados, el número de copias de minicírculo se ve duplicado. En este tiempo los espacios son reparados y la red se vuelve a unir. Por último, las dos redes, cada una conteniendo un complemento completo de minicírculos covalentemente cerrados, son distribuidas a las dos células hijas, durante la división celular. (*Morris, et al., 2001*)

Figura 11
Diagrama esquemático de minicírculos concatenados y libres
(*Morris, et al., 2001*)



d. Diversidad génica

1) Generalidades sobre la diversidad génica de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

Los tripanosomátidos poseen una enorme plasticidad genómica y como consecuencia, muestran una considerable diversidad génica intraespecífica a escala de genes individuales. Esta diversidad ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de los parásitos por especies y cepas, especialmente para análisis taxonómicos con aplicaciones epidemiológicas. (Carrasco, 1996)

Específicamente, el *T. cruzi* tiene alta variabilidad génica, la cual se muestra mejor a escala de ADN y es bastante comparable con una estructura poblacional clonal. La variabilidad génica en *T. cruzi* ha sido demostrada en el lenguaje de proteínas y en el lenguaje de ADN (Macedo, *et al.*, 1998).

a) En el lenguaje de proteínas

En el lenguaje de proteínas la variabilidad génica se mide por análisis isoenzimáticos. Dichos análisis se basan en la separación de enzimas involucradas en la glicólisis celular, por electroforesis, en geles de almidón o acetato de celulosa, detectando las enzimas fraccionadas con sustratos precipitables. (Hillis, *et al.*, 1996) Estudios iniciales, en unos pocos *loci*, revelaron una variabilidad discreta isoenzimática, revelando tres a cuatro grupos principales o zymodemos de *T. cruzi* descritos por Miles, *et al.* (1978).

Posteriormente varios investigadores han hecho diversos estudios isoenzimáticos utilizando distintos *loci* y variedad de aislados, y en base a los resultados obtenidos se han hecho varias divisiones génicas de *T. cruzi*, las cuales se resumen más adelante. Un aspecto a considerar es que las isoenzimas son marcadores que se expresan, por lo que se

requiere de un control estricto de la fase del ciclo de vida y las condiciones del cultivo de *T. cruzi* para evitar resultados falsos. (Macedo, *et al.*, 1998)

b) En el lenguaje de ADN

Existen varias técnicas moleculares para analizar la diversidad génica de *T. cruzi* en el lenguaje de ADN. Entre ellas están: el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción “Restriction Fragment Length polymorphism” (RFLP) del kDNA, huella de ADN “DNA fingerprinting”, amplificación al azar de ADN polimórfico “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores unidos a una secuencia simple repetitiva “Simple Sequence Repeat Anchored Primer PCR” (SSR-PCR), cariotipificación, polimorfismo de minixones y de ADN ribosomal, PCR con cebadores específicos simples de baja astringencia (Macedo, *et al.*, 1998), y análisis con microsatélites (Oliveira, *et al.*, 1998), entre otras. Sin embargo, se hace énfasis en las técnicas genéticas moleculares de mayor interés:

1.1 Polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) del kDNA

A escala de ADN, la primera estrategia de variabilidad génica de *T. cruzi* de alta resolución fue el descubrimiento del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) del kDNA. La región variable de 330 pb del kDNA de las moléculas de minicírculos evoluciona lo suficientemente rápido como para producir diferencias entre aislados distintos o aun entre aislados que parecen como idénticos para un conjunto dado de marcadores genéticos en una especie clonal, llamados clonetas o “clonets” (Laurent, *et al.*, 1997), pero no tan rápido como para excluir la identidad genética estable de la cepa. Cada cepa, y en algunos casos cada clon de la misma cepa, presenta un esquizodemo “schizodeme” diferente. El esquizodemo, no es más que el nombre propuesto para el patrón de restricción característico de una cepa. (Macedo, *et al.*, 1998)

Las diferencias entre individuos en el patrón de fragmentos de ADN pueden analizarse con base en el número o distribución de los sitios de restricción. Sustitución, inserción u omisión de bases nucleotídicas se han detectado usualmente utilizando endonucleasas de restricción “restriction endonuclease” que se definen como enzimas aisladas de bacterias que cortan ADN en una posición constante dentro de una secuencia de reconocimiento específica. La especificidad del corte por enzimas de restricción significa que la digestión completa de un alelo de ADN en particular dará como resultado una serie de fragmentos reproducibles. Las variaciones en los patrones de los fragmentos obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción, son conocidas como polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción. (Barry, *et al.*, 1996)

Sustitución de una base nucleotídica o pequeñas inserciones u omisiones pueden crear o eliminar sitios de corte para una enzima en particular, y por lo tanto alterar el número y tamaño de los fragmentos detectados por esa enzima (Hillis, *et al.*, 1996). Los RFLP están dispersos en todo el genoma, y usualmente son heredados como marcadores mendelianos codominantes. Cualquier fragmento de ADN clonado puede detectar potencialmente polimorfismo y servir como un marcador de RFLP. Los marcadores de RFLP pueden ser usados en la construcción de mapas genéticos. No obstante, una de las limitaciones que la técnica de RFLP presenta es que sólo controla la porción del genoma que contiene los sitios de restricción que se están examinando (Barry, *et al.*, 1996).

1.2 Huella de ADN “DNA finger printing”

“DNA finger printing” es otra técnica para explorar la identidad genética de cada cepa de *T. cruzi*. La diferencia de ésta técnica con la de RFLP es que en lugar de analizar el kADN se analiza el ADN nuclear. El “DNA finger printing” tiene aproximadamente el mismo nivel alto de discriminación de cepas y clones como el análisis de esquizodemos. Al mismo tiempo tiene las ventajas de una estabilidad mayor y una simplicidad operacional en comparación con RFLP. Sin embargo, el hecho de que el “DNA finger printing” está basado en

“Southern blots” e hibridización, también implica que necesita cantidades considerables de ADN del parásito. (Macedo, *et al.*, 1998)

1.3 ADN polimórfico amplificado al azar “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)

RAPD es una técnica alternativa para detectar variación específica en la reacción en cadena de la polimerasa, “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Esta técnica está diseñada para detectar cambios en la secuencia dentro de los sitios del cebador en el PCR “PCR priming sites”. La sustitución de bases nucleotídicas en el sitio de los cebadores afecta la eficiencia de amplificación, cambiando los fragmentos producidos por un número dado de cebadores. Sin embargo, la habilidad de amplificar un segmento específico también va a ser afectado por grandes inserciones u omisiones entre los sitios de los cebadores y por la calidad de ADN templado, así como también por otros factores que afectan la reacción de PCR. Generalmente RAPD, también conocida como RAPD-PCR, utiliza un cebador de 10 bases para producir una colección genotípica específica de fragmentos de ADN amplificados. (Barry, *et al.*, 1996; Hillis, *et al.*, 1996)

2) Cómo medir la diversidad génica de secuencias y cómo encontrar cuadros abiertos de lectura en secuencias

Para analizar la diversidad génica de secuencias existe una variedad de métodos según la finalidad de los resultados. Pero para efectos de este estudio se analizará:

- a) El método de Higgins-Sharpe para alineación múltiple de secuencias dando como resultado final porcentajes de similitud.
- b) El método de distancia media o método de agrupación en parejas, con media aritmética no ponderada, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA) para medir distancias de poblaciones basado en puntuación de similitud.
- c) El método de Lipman-Pearson para medir identidad entre secuencias.

d) El método de Fickett para encontrar cuadros abiertos de lectura (ORF) en las secuencias.

a) Algoritmo de Higgins-Sharpe

Para alinear secuencias de ADN existen varias herramientas que pueden dividirse, en general, en algoritmos globales y algoritmos locales, los que a su vez se separan por algoritmos que agrupan por parejas (dos secuencias) y por agrupación múltiple. El algoritmo de Higgins-Sharpe es un método de alineación múltiple progresiva de pares de secuencias (Felsenstein, 2002).

Básicamente, en los métodos de alineación múltiple progresiva, todos los segmentos de largo W de la primera secuencia ingresada al algoritmo son comparados con segmentos de la segunda secuencia. En referencia a un sistema de puntuación dado los B mejores pares de segmento son retenidos, y cada uno es comparado con todos los segmentos de largo W en la tercera secuencia. Los B mejores triples son comparados con los segmentos de la cuarta secuencia, etc. (Altschul, 1997)

Las ventajas principales de este método son que el tiempo es proporcional al número de secuencias ingresadas, y que puede jugar fácilmente con patrones de longitud arbitrarios y con sistemas de puntuación complicados. La principal desventaja consiste en que el método es a prueba y error, y por lo tanto no garantiza la optimización de la medida de calidad de alineación que emplea. Un orden distinto de ingreso de las secuencias puede dar resultados diferentes. (Altschul, 1997)

El algoritmo de Higgins-Sharpe calcula puntuaciones en porcentajes de similitud y el resultado final está representado en un dendrograma. Esta puntuación de similitud es calculada inicialmente como puntuación de similitud cruda entre cada par de secuencias, la cual, es calculada utilizando el algoritmo de alineación rápida de Wilbur y Lipman (1983) (PSC, *et al.*, 2000). En general, este último algoritmo permite buscar identidades rápidamente entre las secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, al enfocarse solamente

en grupos de similitud entre dos secuencias, y por lo tanto requiere pocas comparaciones en la búsqueda (Lipman, et al., 1985). Después, estas puntuaciones de similitud son utilizadas para realizar un dendrograma interno utilizando el método de UPGMA, el cual indica al paso de alineación múltiple, en que orden alinear las secuencias para la alineación múltiple final. Las alineaciones múltiples progresivas son representadas en un dendrograma final de similitud (PSC, *et al.*, 2000).

- b) Método de distancia media o método de agrupación en parejas con media aritmética no ponderada, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA)

Existen dos métodos comúnmente usados para inferir árboles filogenéticos a partir de datos de secuencia: métodos de parsimonia y métodos de distancia. Para efectos de este estudio se analizará uno de los métodos de distancia, el UPGMA. La definición más simple de distancia entre secuencias es el porcentaje de divergencia (100% menos el porcentaje de similitud).

El método de distancia media, UPGMA, requiere que todas las secuencias evolucionen a una misma razón, ya que si evolucionan de acuerdo al reloj, y el grado de divergencia entre dos genes implica que éstos han estado divergiendo por t generaciones, entonces se puede inferir que los genes están separados, de un ancestro común, $t/2$ generaciones anteriores. (Hartl, *et al.*, 1997)

Con una matriz de distancias en parejas se construye el árbol filogenético al agrupar primero las dos secuencias con la distancia más pequeña. Después, una nueva matriz es construída con el grupo de secuencias ahora considerado cómo una unidad. Si el grupo de secuencias se clasificaron como i y j , entonces para todo $k \neq i, j$ la distancia de k al grupo $\{i, j\}$ es $d_{k(ij)} = 1/2 (d_{ik} + d_{kj})$. En palabras, la distancia de cualquier secuencia k al grupo $\{i, j\}$ es la media de la distancia de la secuencia k a cada una de las secuencias i y j en el grupo. La nueva matriz de distancia es de nuevo buscada para el elemento más

pequeño, y la agrupación apropiada sucede de nuevo. Este proceso se repite hasta que todas las secuencias hayan sido agrupadas en un árbol. (Hartl, *et. al.*, 1997)

c) Algoritmo de Lipman-Pearson

El algoritmo de Lipman-Pearson sirve para encontrar identidad de secuencias. Es un algoritmo de alineación local, y es llamado FastaA. Este es un método a prueba y error, por lo que el resultado puede ser subóptimo. El programa FastaA rompe las secuencias en “segmentos” llamadas espacios importantes “hotspots” y luego busca alrededor de los segmentos para alineaciones. Para proteínas los segmentos tienen una longitud de dos aminoácidos, y para ADN una longitud de seis pares de base de longitud. La base de datos es preprocesada y almacenada en una tabla por pedazos. La tabla por pedazos es generada para todas las secuencias de largo k (que deben ser fijas y pequeñas, aproximadamente del mismo largo que las palabras) Entonces, el programa localiza los espacios importantes de largo k , y les asigna una puntuación a cada uno de ellos. Los espacios importantes que están cerca uno del otro y que pueden ser combinados son buscados detalladamente en las secuencias. (Gupta, 2000; Lipman, *et al.*, 1985)

d) Método de Fickett

El método de Fickett es también llamado código de prueba o “testcode”. Este método está diseñado para regiones codificadoras que son mayores de 200 pares de base (con un 95% de confiabilidad). Por lo que una de las limitaciones de este método es que no toma en cuenta muchas secuencias codificadoras que son considerablemente más cortas que las 200 pb (MacVector, 2002). La estadística de Fickett no requiere de una tabla de frecuencia de codones. (GCG, 2002)

El método de Fickett utiliza ocho parámetros que están basados en propiedades periódicas de cada uno de los cuatro nucleótidos en la secuencia. Los primeros cuatro parámetros son llamados parámetros de posición. Se lleva una cuenta del número de veces que A aparece en la posición de codón 1 (A1), el número de veces que aparece en la posición de codón 2 (A2), y el número de veces que aparece en la posición de codón 3 (A3) en la secuencia de ADN. (MacVector, 2002)

El primer parámetro, Posición -A, se define como:

$$\text{Posición-A} = (\max(A1, A2, A3)/\min(A1, A2, A3))$$

El parámetro de posición para las otras tres bases son computadas similarmente. Los últimos cuatro parámetros son los parámetros de contenido. Estos sólo son la composición porcentual de la secuencia para cada una de las cuatro bases (%A, %C, %G, %T). (MacVector, 2002)

El método de Fickett calcula cada uno de los ocho parámetros para un número conocido de regiones codificadoras y no codificadoras. Este método le asigna peso, W, a cada uno de los parámetros de acuerdo al porcentaje de tiempo que una región codificadora puede ser correctamente predicha, utilizando sólo el valor de ese parámetro. Además, calcula la probabilidad de codificación, P, para 10 intervalos de cada uno de los valores de los parámetros. (MacVector, 2002)

Una vez obtenidos los pesos y las probabilidades para cada uno de los ocho parámetros, estos son combinados para definir un único valor indicador TESTCODE:

$$\text{Indicador} = P1W1 + \dots + P8W8$$

Fickett inicialmente examinó la distribución de los valores indicadores de 321 fragmentos de secuencias codificadoras y en 249 fragmentos de secuencias no codificadoras. Sólo el 29% de las regiones con valores indicadores abajo de 0.74 eran regiones codificadoras,

mientras que un 92% de las regiones con valores indicadores arriba de 0.95 eran regiones codificadoras. (MacVector, 2002)

Por lo tanto, el método de Fickett asigna como región no codificadora a aquella que contenga una probabilidad de codificación menor de 0.29, mientras que asigna como región codificadora a aquella que tenga una probabilidad de codificación arriba de 0.92. Regiones con probabilidades entre estos valores son marcadas como sin opinión. (MacVector, 2002)

El método de Fickett tiene dos limitaciones. Como se había mencionado anteriormente, puede que los resultados no sean válidos para secuencias < 200 bases (67 codones). Por otro lado, no puede distinguir el cuadro de lectura abierto correcto o la hebra correcta. Por lo tanto, si se tiene más de un cuadro de lectura abierto en una región asignada como codificadora, se debe utilizar otro método para determinar cuál es el cuadro de lectura correcto. (MacVector, 2002)

e. Estructura de la población y tipificación génica del *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

La habilidad de tipificar las cepas de *T. cruzi* es importante para el control epidemiológico de la enfermedad de Chagas, y para la evaluación del impacto de la diversidad génica del parásito en la patogenicidad y resistencia a drogas (Barnabe, *et al.*, 2000). Diversos estudios de polimorfismo intraespecíficos de cepas de *T. cruzi* han demostrado una desviación drástica de las estimaciones de diversidad génica calculadas con Hardy-Weinberg, mostrando un desequilibrio fuerte de unión “strong linkage disequilibrium” (asociación no al azar de genotipos que ocurren en diferentes *loci*), y sugiriendo que la reproducción sexual es rara o ausente y que la estructura de la población es clonal (Barnabe, *et al.*, 2000; Macedo, *et al.*, 1998). Del mismo modo, cada clon representa un linaje que se reproduce por división binaria y se mantiene inalterado por un gran número de generaciones (recombinación génica poca o nula aparentemente) hasta que ocurran mutaciones. (Macedo, *et al.*, 1998)

Las cepas o los aislados se obtienen de vectores triatóminos o mamíferos hospederos de *T. cruzi*. Como ya se había mencionado anteriormente, la población del parásito es clonal, sin embargo puede ser multiclonal. La multiclonalidad se debe probablemente a que pacientes en áreas endémicas son infectados por contactos múltiples con diferentes triatóminos y éstos, de regreso, se alimentan de diferentes individuos infectados. Seguramente, esa promiscuidad propicia la formación de poblaciones multiclonales en los hospederos y vectores, llevando al aislamiento correspondiente de cepas multiclonales en cultivos. (Macedo, *et al.*, 1998; McDaniel, *et al.*, 1993)

La naturaleza multiclonal de *T. cruzi* puede ayudar a obviar algunos problemas de evolución que surgen en poblaciones clonales. Poblaciones asexuales no pueden deshacerse de mutaciones deletóricas, y por lo tanto las acumulan, de acuerdo a la teoría de trinquete de Muller “Muller’s ratchet”. La multiclonalidad puede permitir el establecimiento de relaciones mutuas, que pueden involucrar, por un momento, la complementación metabólica de clones génicamente defectuosos. En principio, esto permitiría una evolución clonal más rápida, teniendo como consecuencia un aumento en la diversidad génica, y pondría en perspectiva la innovación de propiedades biológicas. (Macedo, *et al.*, 1998)

En estudios previos se ha tratado de clasificar las cepas de *T. cruzi* en grupos individualizados utilizando principalmente las isoenzimas, como marcador molecular. En Brazil, Miles, *et al.* (1978), propusieron una clasificación del parásito en tres zymodemos principales (ZI, ZII, y ZIII). Por otro lado, Tibayrenc, *et al.* (1986), utilizaron 15 sistemas de enzimas y lograron describir 43 genotipos de isoenzimas distintos entre 121 aislados de diferente rango ecogeográfico. Sin embargo, no pudieron distinguirlos en grupos discretos que pudieran ser equivalentes a una taxonomía natural. No obstante, en 1995 y 1996, con base en la técnica de electroforesis de enzimas multilocus “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE) y en la técnica de RAPD Tibayrenc logró distinguir dos grupos o linajes filogenéticos importantes: linaje 1 y linaje 2. Estas mismas subdivisiones fueron reconocidas por Souto, *et al.* (1996), sólo que con la numeración opuesta (Barnabe, *et al.*, 2000).

El linaje 1 (formalmente descrito por Miles como zymodemo I), está presente en casi toda área endémica, y se observa frecuentemente en ciclos silvestres; y el linaje 2 (formalmente descrito por Miles como zymodemo II y zymodemo III), a diferencia del otro, predomina en humanos y ciclos domésticos. El linaje 2 puede subdividirse en cinco grupos génicos de menor importancia (2a-e). Estos dos linajes pueden ser equivalentes a unidades de tipificación discretas “discrete typing units” (DTU). El segundo DTU principal puede ser subdividido en cinco subdivisiones menores, 2a-e. Por lo que puede decirse que el *T. cruzi* está subdividido en al menos siete DTU (Barnabe, *et al.*, 2000).

Sin embargo, estos dos principales grupos filogenéticos (linaje 1 y 2) no pueden considerarse como subespecies, debido a que la posición de ciertos genotipos o subdivisiones menores, con respecto a los dos linajes principales, podría ser cuestionado en el futuro. Además, parece ser que la especificidad epidemiológica de estas dos subdivisiones, enfatizadas por Souto y colaboradores, (1996), no está clara cuando se analizan países distintos a Brazil (Barnabe, *et al.*, 2000).

La clasificación de DTU, hecha por Tibayrenc, puede correlacionarse con otras clasificaciones hechas anteriormente por distintos investigadores (Barnabe, *et al.*, 2000), lo cual se resume en el cuadro 1.

Es de importancia notar que los tres zimodemos principales descritos por Miles, *et al.* (1978), permanecen informativos, como genotipos de *T. cruzi* polares y relacionados distintamente (Barnabe, *et al.*, 2000).

No obstante, todas estas clasificaciones, junto con otros estudios, han llevado a una concordancia fuerte entre filogenias generadas por diferentes marcadores genéticos por un lado, isoenzimas y RAPD (Tibayrenc, *et al.*, 1993), e isoenzimas y electroforesis de gel pulsada (Sanchez, *et al.*, 1993). Por otro lado, los microsatélites estudiados por Oliveira y colaboradores, en 1998, muestran claramente que el intercambio génico no es lo suficientemente frecuente como para que haya una fuerte confusión entre la estructuración de *T. cruzi* y los DTU.

Cuadro 1
Subdivisiones génicas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) propuestas anteriormente
y las propuestas por Tibayrenc en 1998.
(Barnabe, *et al.*, 2000)

Clasificación por Tibayrenc, 1998	Clasificaciones previas							
	A	B*	C	D	E*	F	G	H
DTU 1	ZI	Z IV	Bol y Braz Z 1	1 a 25	Z2, 5, 7, 10 ó 12	Linaje 2	1 a 4 y 6 a 8	<i>T. cruzi</i> I
DTU 2	---	---	---	26 a 43	---	Linaje 1	5, 9 y 10	<i>T. cruzi</i> II
DTU 2a	ZIII	---	Braz Z3	27a 29	---	---	---	---
DTU 2b	Z II	Z I	Braz Z 2	30 a 34	Z 4 ó 11	---	---	---
DTU 2c	---	---	---	35 a 37	---	---	---	---
DTU 2d	---	---	Bol Z 2	38, 39	Z1, 3, 9	---	---	---
DTU 2e	---	Z III	---	40 a 43	---	---	---	---

* No fue posible establecer la correlación de los zimodemos II (Romanha *et al.* 1979) y Z6 y Z8 (De Luca D'Oro *et al.* 1993) con la de Tibayrenc (1998).

<< (Columna A, Miles *et al.* (1978) basado en 3 zimodemos principales; columna B, Romanha *et al.* (1979) basado en cuatro zimodemos; columna C, Tibayrenc y Miles (1983) basado en cuatro zimodemos; columna D, Tibayrenc & Ayala (1988) basado en 43 genotipos clonales; columna E, De Luca D'Oro *et al.* (1993) basado en 12 zimodemos; columna F, Souto *et al.* (1996) basado en dos linajes genéticos; columna G, Higo *et al.* (1997) basado en 10 zimodemos; y columna H, del Simposio Internacional para conmemorar el 90^{vo} aniversario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Recomendaciones de una sesión Satélite (1999) basado en dos grupos de *T. cruzi* >> (Barnabe, *et al.*, 2000)

Interesantemente, los DTU 2d y 2e corresponden a grupos de genotipos de mayor difusión y por ello se les llama clones principales. (Barnabe, *et al.*, 2000)

También se han realizado estudios de diversidad génica de *T. cruzi* utilizando como marcador las moléculas de minicírculo de dicho parásito. Estos estudios se han realizado con análisis de esquizodemos de la región variable del ADN de minicírculo de *T. cruzi* amplificada por PCR con oligonucleótidos degenerados (S35 5' AAA TAA TTG TAC GGG (T/G)GA GAT GCA TGA 3'; y el cebador S36 5' GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3'). La región variable amplificada (aproximadamente 330 pb) es un marcador especie específico y posiblemente cepa específica, siendo ideal para la detección y clasificación de *T. cruzi*. (Avila, *et al.*, 1990)

Por último cabe mencionar que en Bolivia se han encontrado la transmisión y circulación de dos clonetas principales en el ciclo doméstico del vector *Triatoma infestans* (*T. infestans*), principal vector de la enfermedad de Chagas en Bolivia: cloneta 20 y cloneta 39; lo cual apoya la existencia de dos grupos o linajes filogenéticos de *T. cruzi*, descrita

anteriormente por varios autores. Este hallazgo de la existencia de dos clonetas principales, se pudo obtener con base en la técnica MLEE y con base en la técnica RAPD de la región hipervariable del kDNA de los minicírculos de *T. cruzi*, amplificada por PCR. (Breniere, *et al.*, 1998)

C. Vectores de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

1. Distribución taxonómica de los vectores

Como se había mencionado anteriormente, los vectores que transmiten el *T. cruzi* son hemípteros hematófagos obligados de la subfamilia Triatominae (Monteiro, *et al.*, 2001). Los triatominos adultos son generalmente largos de 2 a 3 cm, algunos de los cuales se han adaptado para colonizar las viviendas de los humanos, especialmente en Latinoamérica. Actualmente se reconocen 118 especies de triatominos con base en sus características morfológicas, agrupadas sin controversia en 14 géneros formando 5 tribus (*vid* cuadro 2) (Schofield, 1994).

2. Distribución geográfica de los vectores

Los triatominos están distribuidos por todo el continente americano y algunas islas del Caribe; aproximadamente entre las latitudes 42N y 46S (Schofield, 1994). Más específicamente, la distribución geográfica empieza desde el sur de Estados Unidos de América (incluye los Estados de Arizona, Florida, California, Colorado, New Mexico, Utah, y Texas) (Ryckman, 1986), sigue con México, Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador, Guyana, Brazil, Perú, Paraguay, Uruguay, Chile, y termina con Argentina (*vid* figura 12) (Guevara, *et al.*, 2001; Schofield, 1994).

En Guatemala, las dos especies de vectores más importantes son *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*) y *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*), los cuales se ocultan durante el día para luego, durante la noche, atacar a su víctima, siendo por esta razón adaptados completamente a la vigilia nocturna. “En Guatemala se les halla abundantemente en el medio rural, desde aproximadamente los 3,500 pies” (1067 mts) de altura hasta las partes bajas del litoral, con cierta predilección por el ambiente seco de los departamentos orientales de la república, sin que por ello dejen de existir en las zonas húmedas. (Montenegro, 1943)

Cuadro 2
Sistemática de los triatomos que transmiten la Enfermedad de Chagas
(Monteiro, *et al.*, 2001; Schofield, 1994)

Tribu	Género
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i> (1 sp.) <i>Eratyrus</i> (2 ssp.) <i>Linshcosteus</i> (5 spp.) <i>Panstrongylus</i> (13 spp.) <i>Paratriatoma</i> (1 sp.) <i>Triatoma</i> (68 spp.)
Rhodniini	<i>Psammolestes</i> (3 spp.) <i>Rhodnius</i> (12 spp.)
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i> (2 spp.)
Bolboderini	<i>Belminus</i> (4 spp.) <i>Bolbodera</i> (1 sp.) <i>Microtriatoma</i> (2 spp.) <i>Parabelminus</i> (2 spp.)
Alberprosenini	<i>Alberprosenia</i> (2 spp.)

a. *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*)

T. dimidiata es una especie bastante grande, de colorido distintivo (*vid* figura 13). Es un vector importante de la enfermedad de Chagas en Centroamérica donde, a menudo, su distribución geográfica coincide parcialmente con la de *R. prolixus*. Cuando las dos especies de vectores se encuentran juntas, como ocurre en El Salvador, *R. prolixus* parece predominar a altitudes menores de 300 m, y *T. dimidiata* en las casas situadas a alturas de más de 300 m. (Schofield, 1994)

Figura 12
 Distribución geográfica de los triatominos selváticos y domésticos
 causantes de la Enfermedad de Chagas
 (Monteiro, *et al.*, 2001; OPS, 1992; Ryckman, 1986; Schofield, 1994)



- Distribución selvática de triatominos (La enfermedad de Chagas existe como zoonosis).
- Distribución domiciliar de triatominos (la enfermedad de Chagas está presente en humanos).

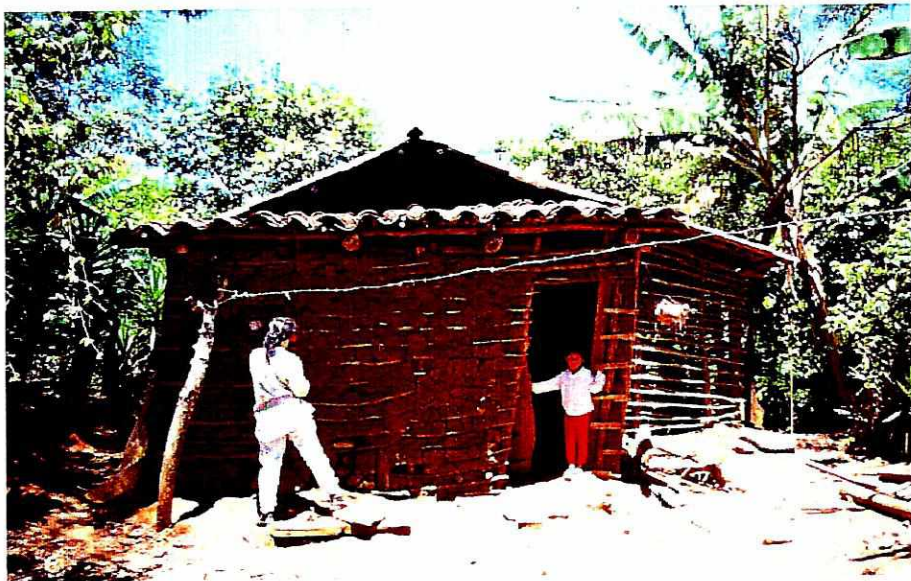
Figura 13
Triatoma dimidiata (*T. dimidiata*)
 (Caramello, 2001)



1) Hábitat

T. dimidiata se ha encontrado en una variedad de ecótopos selváticos, sobretodo en montones de rocas y cuevas ocupadas por murciélagos. A veces las chinches se encuentran también en árboles huecos, y se cree que la recolección de leña representa uno de los métodos por los cuales las chinches pueden introducirse en las casas (Schofield, 1994; Zeledon, 1981). Además, *T. dimidiata* muestra preferencia por las grietas de las paredes, los espacios entre adobes y en construcciones denominadas bajareques (*vid* figura 14) (Montenegro, 1943). Las ninfas tienen hábitos crípticos, a menudo camuflándose con polvo con que se cubren la superficie dorsal, y en las casas de Costa Rica parecen preferir las grietas a nivel del piso o en espacios en y debajo de las tablas del suelo. Sin embargo, las colonias domésticas tienen tendencia a ser relativamente pequeñas, y esta especie tiene un intervalo entre las generaciones excepcionalmente prolongado, tardando a menudo más de un año en completar su desarrollo desde el huevo hasta el adulto (Schofield, 1994).

Figura 14
Guatemala: tipo de casa propicia a infestación por triatominos
(Dorn, 2001)



2) Distribución geográfica

Los principales lugares en donde ha sido encontrado *T. dimidiata*, por países, en orden geográfico de Norte a Sur, son los siguientes (*vid* figura 15):

- Mexico: Campeche, Chiapas, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, Yucatán. (Zeledon, 1981)
- Guatemala: *T. dimidiata* se encuentra en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Jutiapa, Petén, San Marcos, Santa Rosa, Zacapa, Izabal (Monroy, *et al.*, 1993; Zeledon, 1981). No obstante, la incidencia de seropositivos está mejor documentada en Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Jalapa, y Santa Rosa (*vid* figuras 16 y 20) (Cordón, 2002).
- Belice: El Cayo, Toledo. (Zeledon, 1981)
- Honduras: Comayagua, Copán, Choluteca, El Paraíso, Francisco Morazán, Intibucá, La Paz, Lempira, Olancho, Ocotopeque, Santa Bárbara, Yoro. (Zeledon, 1981)
- El Salvador: Ahuachapán, Cabañas, Cuscatlán, Chalatenango, La Libertad, San Salvador, San Vicente, Santa Ana, Sonsonate, Usulután. (Zeledon, 1981)
- Nicaragua: Jinotega, Madriz, Matagalpa. (Zeledon, 1981)

- Costa Rica: Alajuela, Cartago, Guanacaste, Heredia, Limón, Puntarenas, San José. (Zeledon, 1981)
- Panamá: Bocas del Toro, Coclé, Colón, Chiriquí, Darién, Panamá, Veraguas, Zona del Canal. (Zeledon, 1981)
- Colombia: Cundinamarca, Hila, Magdalena, Norte de Santander, Santander, Bocaya Soatá, Miraflores, Guayata, Guatepeque. (Zeledon, 1981)
- Venezuela: Bolivar Carabobo, Cojedes, Distrito, Territorio Delta Amacuro, Yaracuy. (Zeledon, 1981)
- Guyana. (Zeledon, 1981)
- Ecuador: El Oro, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Manabí. (Zeledon, 1981)
- Perú: Tumbes. (Zeledon, 1981)

b. *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*)

R. prolixus (vid figura 17) es uno de los vectores domésticos principales de la enfermedad de Chagas. Las 12 especies de *Rhodnius* descritas son todas de hábito arbóreo, a menudo asociadas con especies particulares de palmeras. *R. prolixus* es fácil de criar en el laboratorio, y sus órganos internos de colores facilitan la disección exacta (ej. aorta dorsal verde, glándulas salivares rojas, intestino medio marrón, ovarios rosas, y cuerpo graso amarillo cremoso). La mayor parte de las especies de *Rhodnius* pueden distinguirse por sus características morfológicas evidentes, pero *prolixus*, *robustus*, *neglectus* y *nasutus* pueden ser difíciles de separar con certeza. *R. prolixus*

puede realizar su desarrollo desde el huevo hasta el adulto en tres a cuatro meses y puede alcanzar densidades de población altísimas en las casas. (Schofield, 1994)

1) Hábitat

R. prolixus es una especie domesticada y raramente se encuentra en la selva (Monteiro, *et al.*, 2001); parece tener predilección por sitios recubiertos de paja, hoja de caña, troncos, tablas, y papeles. (Montenegro, 1943)

Figura 15
Distribución geográfica mundial de *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*)
(OPS, 1992; Zeledon, 1981)



2) Distribución geográfica

R. prolixus está presente en Venezuela, Colombia, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, y una parte de México (*vid* figura 18) (Schofield, 1994). En Guatemala se encuentra en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa, Jalapa, Chiquimula, El Progreso, Zacapa, y San Marcos (*vid* figuras 16 y 19). (Monroy, *et al.*, 1993)

3. Nombres vulgares de los triatomíneos

En México el nombre vulgar del insecto vector es chinchona, chinche picuda, chinche de vaca, chinche de monte, chinchupa y telepate. En Guatemala dichos insectos son conocidos como chinche picuda, chinche de vaca, chinche de monte, telepate y talaje. En El Salvador, chinche cuerudo, talaje (a las ninfas) y telepate en la región fronteriza con Guatemala. En Belice se le dice “bush chinch”. En Costa Rica se le conoce con los nombres de chincha, chinche bebesangre, chinche mamona, chinche de suelo. En el litoral de Ecuador, chinchorro o chupasangre y en la región meridional, chinche de caballo. En el norte de Perú se le llama chinchón a los adultos y pelados a las ninfas. (Zeledon, 1981)

Figura 16
 Distribución geográfica de *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*)
 y *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*) en Guatemala
 (Cordón, 2002)

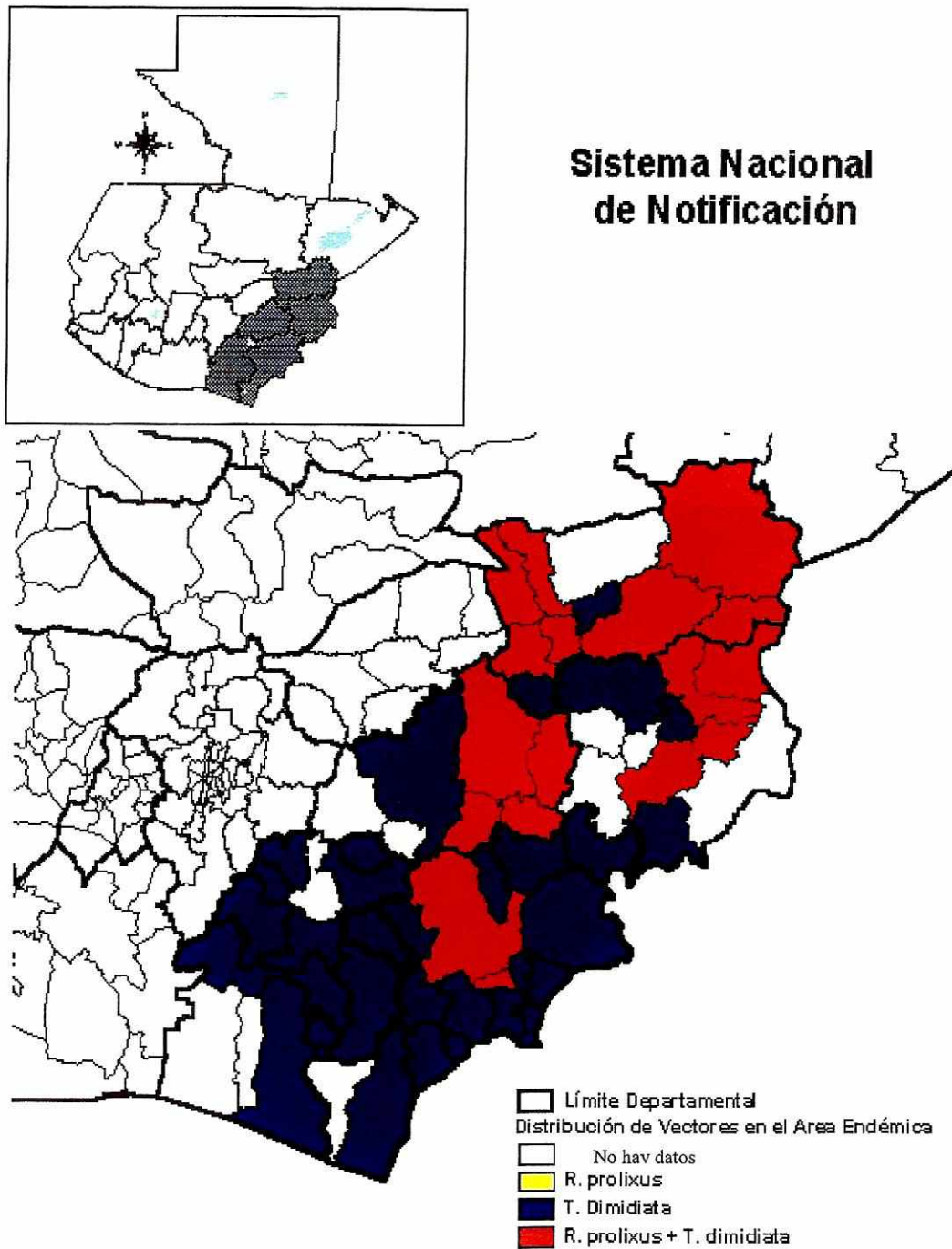


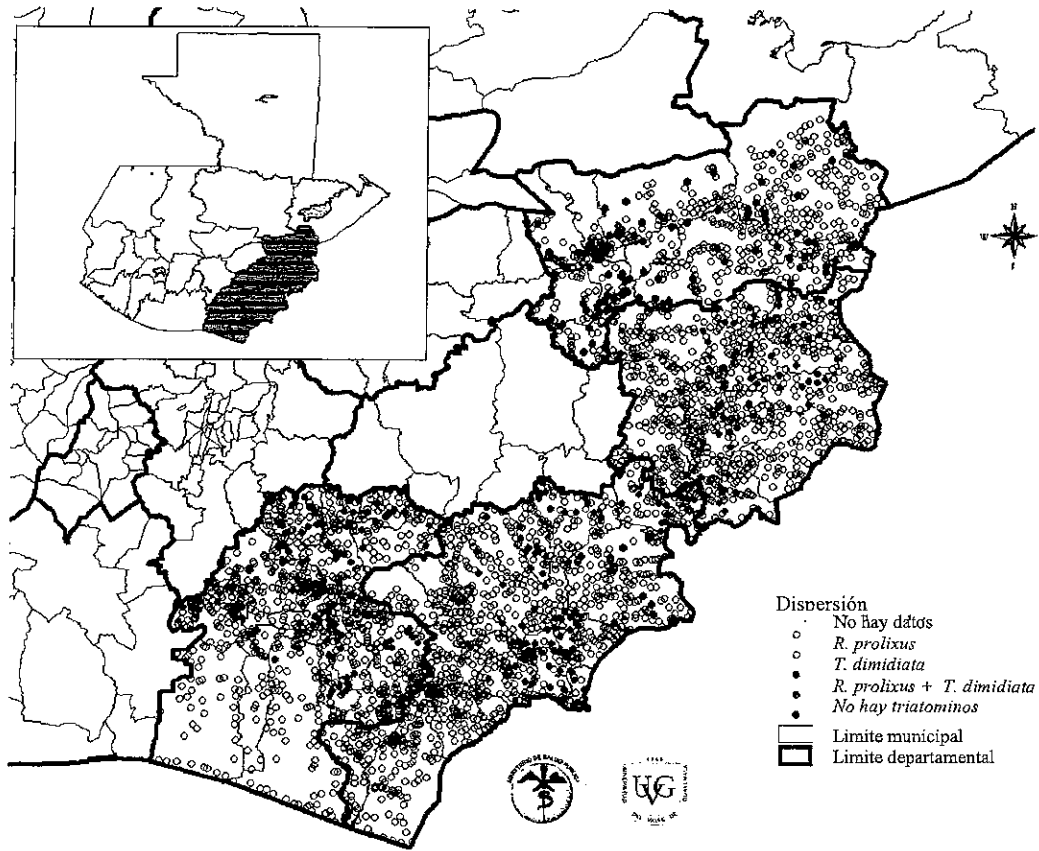
Figura 17
Rhodnius prolixus (*R. prolixus*) adulta comiendo sangre a través de piel humana.
(WHO, *et al.*, 2000)



Figura 18
Distribución geográfica mundial de *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*)
(OPS, 1992)



Figura 19
Distribución geográfica de *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*) en Guatemala
(Codón, 2002)



Dispersión de triatomines domiciliars, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, por comunidad en Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, y Santa Rosa. Encuesta entomológica de los vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala, mayo 2000 a febrero 2001. Los puntos representan comunidades. Proyecto No. 990545 de WHO y TDR (Traducido al español de la fuente "Entomological baseline survey of Chagas Disease vectors in Guatemala, May 2000-February 2001")

D. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas

La distribución geográfica aproximada de la enfermedad de Chagas coincide con la de los vectores de dicha enfermedad (*vid* figura 12). La región coloreada de verde representa las áreas donde la enfermedad de Chagas existe como una zoonosis en mamíferos salvajes. La región coloreada de rojo representa las áreas donde existe la enfermedad de Chagas en humanos. (Monteiro, *et al.*, 2001; Schofield, 1994)

En Guatemala, en un estudio realizado por Hurtarte, *et al.* (1993), se identificaron varios departamentos endémicos de la enfermedad de Chagas. Entre los departamentos con vector y con casos de la Enfermedad de Chagas se encuentran Guatemala, Baja Verapaz, El Progreso, Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa y Santa Rosa (Hurtarte, *et al.*, 1993). De los departamentos reportados con vectores y casos se escogieron, para este estudio, los cinco que contienen más casos endémicos: Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa y Santa Rosa (*vid* figura 20).

E. Sintomatología de la Enfermedad de Chagas

De forma típica, la infección con *T. cruzi* tiene un período de incubación de una a dos semanas, generalmente sin síntomas (Macedo, *et al.*, 2002; Schofield, 1994). Los síntomas generales de la enfermedad de Chagas pueden incluir fiebre, hepatoesplenomegalia y adenopatías (Guevara, *et al.*, 1997). No obstante, existe gran variabilidad en las manifestaciones clínicas (megaesófago, megacolon o cardiomegalia) en distintos pacientes, ya que unos desarrollan una manifestación y otros no. Una hipótesis propuesta para explicar la variabilidad en las manifestaciones es que depende del área geográfica donde se encuentre el paciente. Esta variabilidad es en parte atribuible a la variación génica del parásito, lo cual es apoyado por los estudios de cepas en tejidos (teoría clonal), donde radica la importancia epidemiológica de estudios de variabilidad genética del parásito (Macedo, *et al.*, 2002).

En cuanto a la infección, se puede dar en tres fases:

1. Fase aguda

Suele durar dos a cuatro meses (Schofield, 1994), y pasa generalmente imperceptible,

aunque puede haber un área inflamada o chagoma en el sitio de entrada de los tripanosomas. El síntoma de Romaña (*vid* figura 21) es cuando la hinchazón involucra los párpados (ocurre únicamente entre 1% a 2% de los casos). La mortalidad asociada a esta fase ocurre en menos del 5% y la muerte resulta de una deficiencia cardíaca o de una meningoencefalitis en niños menores de dos años (Guevara, *et al.*, 1997).

2. Fase intermediaria

Esta fase es clínicamente asintomática y es detectada por la presencia de anticuerpos específicos. Ningún parásito es encontrado en un frotis sanguíneo, pero el xenodiagnóstico puede ser positivo en algunos casos. (Guevara, *et al.*, 1997)

3. Fase crónica

Se desarrolla de 10 a 20 años después de la infección, y afecta órganos internos vitales como el corazón (*vid* figura 22), el esófago y el colon, al igual que los nervios periféricos del sistema nervioso. Las lesiones dejadas por la enfermedad de Chagas son incurables y en casos severos los pacientes pueden llegar a morir por causa de una insuficiencia cardíaca. Aunque el *T. cruzi* infecte principalmente el músculo cardíaco, puede ser parásito de cualquier tipo de célula (células del músculo liso, histocitos). (Guevara, *et al.*, 1997)

Figura 20
 Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas en departamentos endémicos de Guatemala
 (Cordón, 2002)

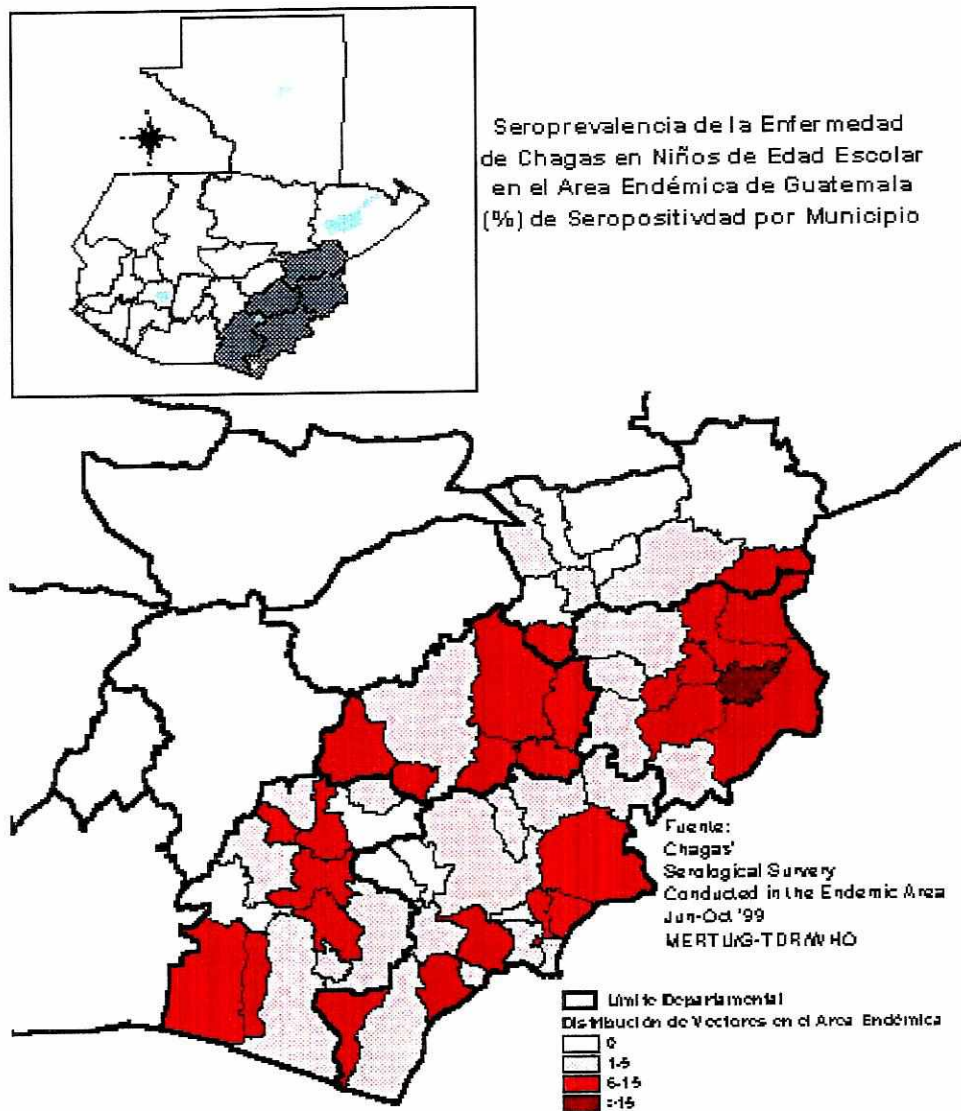


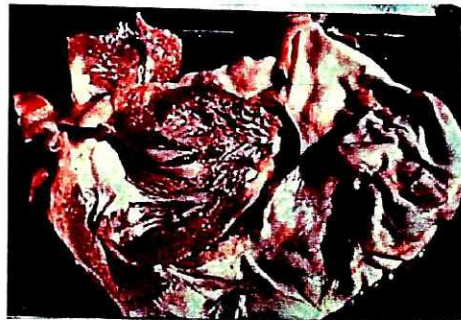
Figura 21

Fase aguda de la Enfermedad de Chagas en una niña de Sao Felipe, Brazil. Presenta el signo de Romaña en el ojo. Este síntoma se observa frecuentemente en casos agudos y se supone que marca el punto de entrada del parásito.
(WHO, *et al.*, 1991)



Figura 22

Ilustración necrótica de cardiopatía de Chagas
(WHO, *et al.*, 1990)



F. Transmisión de la Enfermedad de Chagas

Inicialmente la Enfermedad de Chagas era una zoonosis, ya que era una enfermedad parasítica de animales salvajes (e.g. mamíferos pequeños), transmitida por especies silvestres de triatomíneos, sin que el hombre interviniera en el ciclo natural (Guhl, *et al.*, 2000; Monteiro, *et al.*, 2001). Sin embargo, la domesticación de animales salvajes y la perturbación del área silvestre han favorecido la invasión, y la adaptación creciente de unas especies triatomíneas a las habitaciones de humanos. Esto ha resultado en ciclos accidentales de transmisión domiciliar, teniendo los vectores acceso directo a alimento abundante así como también a protección de cambios climáticos y predadores. Sin embargo, aún existen lugares donde la enfermedad sigue siendo una zoonosis (*vid* figura 12) (Monteiro, *et al.*, 2001).

El *T. cruzi* se puede transmitir al hombre por diversas vías (*vid* cuadro 3), pero la principal es la transmisión por vectores, la cual se podría decir que inicia cuando la chinche contrae la infección alimentándose de un mamífero infectado. Cuando la chinche triatomínea se alimenta, puede defecar al mismo tiempo, evacuando los restos de su comida de sangre anterior. Luego, los *tripanosomas* presentes en las deyecciones pueden penetrar en las mucosas o cualquier herida o abrasión de la piel. La multiplicación local de los parásitos en el punto de entrada precede la parasitemia sanguínea y la proliferación intracelular en varios tejidos, notablemente el músculo cardíaco, el músculo liso, el sistema nervioso autónomo y los fagocitos mononucleares. (Schofield, 1994)

Cuadro 3
 Estimación de las tasas de transmisión de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) al hombre
 expresadas en porcentajes de la incidencia total.
 (Schofield, 1994)

Transmisión por vectores	>80 %
Transmisión por transfusión de sangre	16 %
Transmisión congénita	2%
Otras vías (oral, transplante de órganos, accidente de laboratorio)	<1%

Existen varios factores que facilitan la transmisión vectorial, tal como el ingreso de leña a la cocina, que está cerca del dormitorio, dormir en el suelo, pegar las camas a la pared, nido de ratones o de gallinas dentro de la casa, iluminación solar mínima, ventilación pobre, ubicación de las camas en relación a los vientos (ya que las chinches pueden ser acarreadas por el viento), piso de tierra, construcción de bajereque para *T. dimidiata* y techo de material vegetal para *R. prolixus*, presencia cercana de animales silvestres, entre otros. (Monroy, *et al.*, 1993)

G. Tratamiento y control de la Enfermedad de Chagas

Actualmente aún no se ha encontrado un tratamiento definitivo, ni un medicamento eficaz para combatir la enfermedad de Chagas. Se ha observado que varios tipos de compuestos sintéticos y antibióticos resultan activos contra las formas sanguíneas de la enfermedad en modelos animales. Algunos de los compuestos seleccionados se han ensayado en humanos, donde se ha visto que tienen efectos saludables en la fase aguda, aunque éstos resultados no son muy representativos, ya que en muchos individuos existe una tendencia a mejorar naturalmente en la fase aguda. (Andrade, 1989; Goble, 1992).

Se utilizan diversas drogas como el Nifurtimox, el cual consiste en un derivado del furiledeno-5-nitrofur. La dosis recomendada es de 8.5 a 12.5 mg/kg de peso durante 90 a 120 días. Es eficaz en la fase aguda de la enfermedad. Causa algunos síntomas

colaterales como náuseas, vómitos, pérdidas de peso, convulsiones, entre otros. (Goble, 1992)

El Benzonidazole es un derivado de 2- nitroimidazole, más efectivo en la fase crónica. La dosis recomendada es de 5 mg/kg de peso durante 35 días. Se ha comprobado que el mecanismo de acción contra *T. cruzi* es inhibir la síntesis de proteínas y de ácido ribonucleico. (Goble, 1992)

El Alopurinol se encontraba en período de experimentación en 1990; por lo que se trataron con alopurinol a 51 pacientes con xenodiagnóstico positivo, en una región endémica de Chile, para conocer la eficacia de la droga en el tratamiento de la enfermedad. En este caso la tolerancia fue excelente, sin efectos adversos, por lo que se justificó su utilización como terapia en algunos casos. (Goble, 1992)

Sin embargo, estos tratamientos no son muy efectivos en una población grande, por lo que se debe recurrir a hacer más estudios. A pesar de avances recientes, no se ha logrado crear nuevas vacunas (Schofield, 1994). Esto aumenta el riesgo de que personas no infectadas contraigan la enfermedad ya que, al haber mayor número de personas infectadas, hay mayor probabilidad de que los triatomíneos se infecten; por lo que viene a representar un problema grave de salud para América. No obstante, la eliminación de la población de vectores domésticos por medio de la fumigación, con insecticidas residuales, de casas infestadas constituye una de las alternativas para controlar la enfermedad. (Monteiro, *et al.*, 2001)

En el caso de Guatemala, hasta el presente año, el Ministerio de Salud Pública apoyados por la JICA, empezaron un programa de rociamiento para el control de vectores. Lastimosamente no se había hecho un intento formal para controlar los triatomíneos, ya que la única vez que se había intentado fue en 1954, cuando Peñalver probó, en una pequeña población, insecticidas para el control de dichos vectores. Cabe mencionar que el programa de control de la malaria en Guatemala ayudó considerablemente a la

reducción de los vectores de Chagas en las áreas en donde ambas enfermedades coincidían. (Monroy, *et al.*, 1995)

- H. Estudios de diversidad génica de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en el lenguaje de ADN
- I. Análisis de esquizodemos de cepas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) por medio de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable del minicírculo.

Entre los estudios realizados de análisis de esquizodemos de cepas de *T. cruzi* se encuentra uno importante realizado por Avila, *et al.* En dicho estudio se utilizó el kDNA total aislado de 56 muestras de *T. cruzi* (35 muestras de Brasil, 11 cepas de laboratorio, dos muestras de Colombia, seis muestras de Venezuela y dos muestras de Costa Rica) aislado de pacientes humanos, animales e insectos. El kDNA total fue digerido con EcoRI y los patrones de restricción fueron comparados en geles de gradiente de acrilamida (5.5% a 10%), teñidos con nitrato de plata. En base a los patrones de restricción obtenidos, se lograron agrupar 14 muestras de Brasil provenientes de humanos en dos esquizodemos: α y β , mientras que las demás muestras no pudieron ser clasificadas. Sin embargo, por examinación cualitativa de los patrones de restricción de las 34 muestras no clasificadas, se pudo observar que estas caían en tres subgrupos. No obstante, se requiere de un análisis más profundo para determinar si estos subgrupos son válidos. Al mismo tiempo, a las mismas 56 muestras se les hizo un análisis de esquizodemos utilizando fragmentos de ADN de 330 pb, que representan las regiones variables del ADN del minicírculo, las cuales fueron amplificadas por la técnica de PCR, utilizando como templado el kDNA total e iniciadores localizados en los extremos de la región conservada: el oligonucléotido degenerado P35: 5' AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA 3' y el cebador P36: 5' GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3' (*vid* figura 6 para localización de los iniciadores). El análisis de esquizodemos se hizo utilizando las enzimas de restricción RsaI, TaqI, y HinfI. Los resultados obtenidos con este análisis fueron consistentes con el análisis donde se utilizó el kDNA total, pero

los patrones de restricción de los fragmentos de 330 pb fueron más informativos que el kDNA total, permitiendo construir esquizodemos adicionales, de manera que se obtuvieron seis esquizodemos indicados como S1 a S6. El esquizodemo S1 correspondió al esquizodemo α obtenido con kDNA total y el esquizodemo S4 correspondió al esquizodemo β . Por último, dichos investigadores concluyeron que es importante comparar los patrones de digestión obtenidos con varias enzimas de restricción para hacer deducciones firmes sobre la relación de varias cepas o aislados de *T. cruzi*. (Avila, *et al.*, 1990)

2. Análisis del ADN cinetoplasto (kDNA) utilizando la técnica de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciador específico de baja astringencia “low stringency specific primer PCR” (LSSP-PCR)

La técnica de PCR con iniciador específico de baja astringencia, LSSP-PCR, se puede utilizar para distinguir el ADN del parásito del ADN del huésped. Esta técnica se basa en amplificar por PCR, con iniciadores específicos, el fragmento de ADN de interés. El producto obtenido es purificado y sujeto a otra reacción de PCR utilizando ahora solo un iniciador específico con condiciones de astringencia bajas. El iniciador se hibridiza específicamente a su región complementaria y también se hibridiza no específicamente a sitios múltiples dentro del fragmento, de una manera dependiente de secuencia, produciendo varios grupos complejos de productos de reacción. Estos productos de reacción pueden ser separados por electroforesis en acrilamida para generar un patrón de gene “gene signature”. En el estudio de la Enfermedad de Chagas, ésta técnica se basa en el uso de iniciadores específicos (S35/S36) para amplificar la región variable del kDNA del parásito que proviene directamente de muestras de sangre o biopsias y luego sondear la variación de secuencias en el fragmento de ADN amplificado específico del parásito. (Macedo, *et al.*, 2002)

La técnica de LSSP-PCR ha sido exitosamente aplicada a la región variable de ADN de ~330 pb del kADN del minicírculo de *T. cruzi* para producir un patrón de gene. Esto se mostró en el estudio realizado por Macedo, *et al.* (1996). En dicho estudio se diseñó la técnica de LSSP-PCR y se utilizó el oligonucleótido degenerado S35 como iniciador

específico, con condiciones de baja astringencia, para analizar distintas muestras. Las muestras provenían de: tejidos de corazón de animales infectados aguda y crónicamente con *T. cruzi*, de muestras de parásitos cultivados, cepa CL y cepa Y y clones de la cepa Y, y de muestras de tejido de corazón humano, que tenía miocardiopatía chagásica crónica. Los resultados obtenidos en dicho estudio demostraron que los marcadores mitocondriales de ADN pueden ser utilizados para estudiar indirectamente la variabilidad en el genoma nuclear, debido al desequilibrio de unión “linkage disequilibrium” resultante de la estructura de población clonal del parásito. Cuando la técnica de LSSP-PCR se aplicó a ratones infectados en el laboratorio reveló concordancia perfecta entre los patrones de kDNA del tejido de corazón de dichos animales, infectados aguda e infectados crónicamente, con el patrón correspondiente de los parásitos cultivados. (Macedo, *et al.*, 1996)

3. Estudios de infecciones mixtas en *Triatoma infestans* (*T. infestans*) de Bolivia.

En un estudio realizado por Bosseno, *et al.* (1996), sobre la distribución amplia de dos genotipos clonales en *T. infestans* recolectados en Bolivia se mostró una alta frecuencia de infecciones mixtas en dichos vectores. Esto se logró realizar utilizando sondas de la cloneta 20 y cloneta 39, clonetas ampliamente distribuidas en Bolivia, para hibridizarlas con 186 muestras de heces amplificadas por PCR, que eran positivas para *T. infestans*, provenientes de dos departamentos del país. Los resultados mostraron que había infección mixta en las heces, de lo cual 74.2% era perteneciente a la cloneta 20 y 63.4% era perteneciente a la cloneta 39. Estos resultados concordaron con dos suposiciones:

- i) De transmisión independiente de las clonetas 20 y clonetas 39.
- ii) De la ausencia de selección en ciclos naturales de sobrevivencia.

Por último, análisis estadísticos de la distribución geográfica de las clonetas 20 y 39 favorecieron la hipótesis que la frecuencia de las clonetas naturales de *T. cruzi* son diferentes entre localidades y que estas diferencias no son proporcionales a la distancia que separa las localidades. (Bosseno, *et al.*, 1996)

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A. Hipótesis

Existe variabilidad génica en la región hipervariable del ADN cinetoplasto del minicírculo entre aislados de *T. cruzi* en estadio epimastigote obtenidos de los triatomíneos *T. dimidiata* y *R. prolixus*, recolectados en distintas áreas endémicas de Guatemala.

B. Objetivo general

Determinar la variabilidad génica de 17 aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos recolectados en distintas áreas endémicas de Guatemala, entre ellas Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Zacapa.

C. Objetivos específicos:

1. Amplificar, y clonar la región hipervariable del minicírculo del ADN total de aislados de *T. cruzi*, obtenidos de *T. dimidiata* y *R. prolixus*, recolectados en Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Zacapa.
2. Analizar por el método de RFLP's la región hipervariable del ADN cinetoplasto del minicírculo, amplificada y clonada, de 17 aislados de *T. cruzi* utilizando la enzima de restricción RsaI.
3. Determinar la secuencia, automatizadamente, de dos clones de la región hipervariable del ADN cinetoplasto del minicírculo de cada aislado de *T. cruzi* utilizando el secuenciador ABI PRISM 3,100.

4. Determinar posibles sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII, AluI, y Sau3AI de los clones de la región hipervariable del ADN cinetoplasto secuenciados utilizando el “software” DNAsis.

5. Determinar la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto entre:
 - Cada aislado de *T. cruzi*
 - Aislados de *T. cruzi* del mismo departamento
 - Aislados de *T. cruzi* de distintos departamentos

por medio de secuenciación automatizada, utilizando el secuenciador ABI 3100

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles.

A. Parásito e insectos.

17 aislados de *T. cruzi*, en estadio epimastigote, fueron utilizados para este estudio. Estos aislados se obtuvieron de vectores triatominos, tal como *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, recolectados al azar en Guatemala, en cinco departamentos endémicos con la enfermedad de Chagas, en el año 2000; gracias al financiamiento por parte del proyecto Chagas de TDR. Dichos departamentos son Zacapa, Jutiapa, Jalapa, Santa Rosa y Chiquimula. La distribución y localización de los aislados analizados se presentan en las figuras 23 y 24, y en el cuadro 4. La obtención de parásitos se hizo a partir de las chinches que eran positivas para *T. cruzi*, al extraer heces por punción rectal. Estas chinches fueron diseccionadas bajo la campana de flujo laminar, para mantener condiciones estériles. 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, teniendo la precaución de no hacerles alguna rotura, y se colocaron en un tubo eppendorf con 100 μ L de solución salina de fosfatos amortiguadora “phosphate buffer saline” (PBS) a pH 7.4 (a concentración final de 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7mM Na₂HPO₄7H₂O, y 1.4 mM K₂HPO₄). La suspensión de intestinos fue homogenizada con un pistilo estéril. Seguidamente, se agregó 1 mL de PBS a pH 7.4 con penicilina y estreptomicina a 3000 unidades/mL, dejándolo reposar a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 3 mL del medio Infusión de triptosa e hígado “Liver Infusion Tryptose” (LIT) y suero bovino fetal 10%, con 500 μ L del macerado. Este cultivo se observó por un mes, una vez por semana (Pennington, 2001). Cuando el parásito en dicho cultivo llegó al estadio epimastigote, se extrajo una alícuota de 1 mL 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.

Figura 23
Departamentos endémicos con la Enfermedad de Chagas en Guatemala

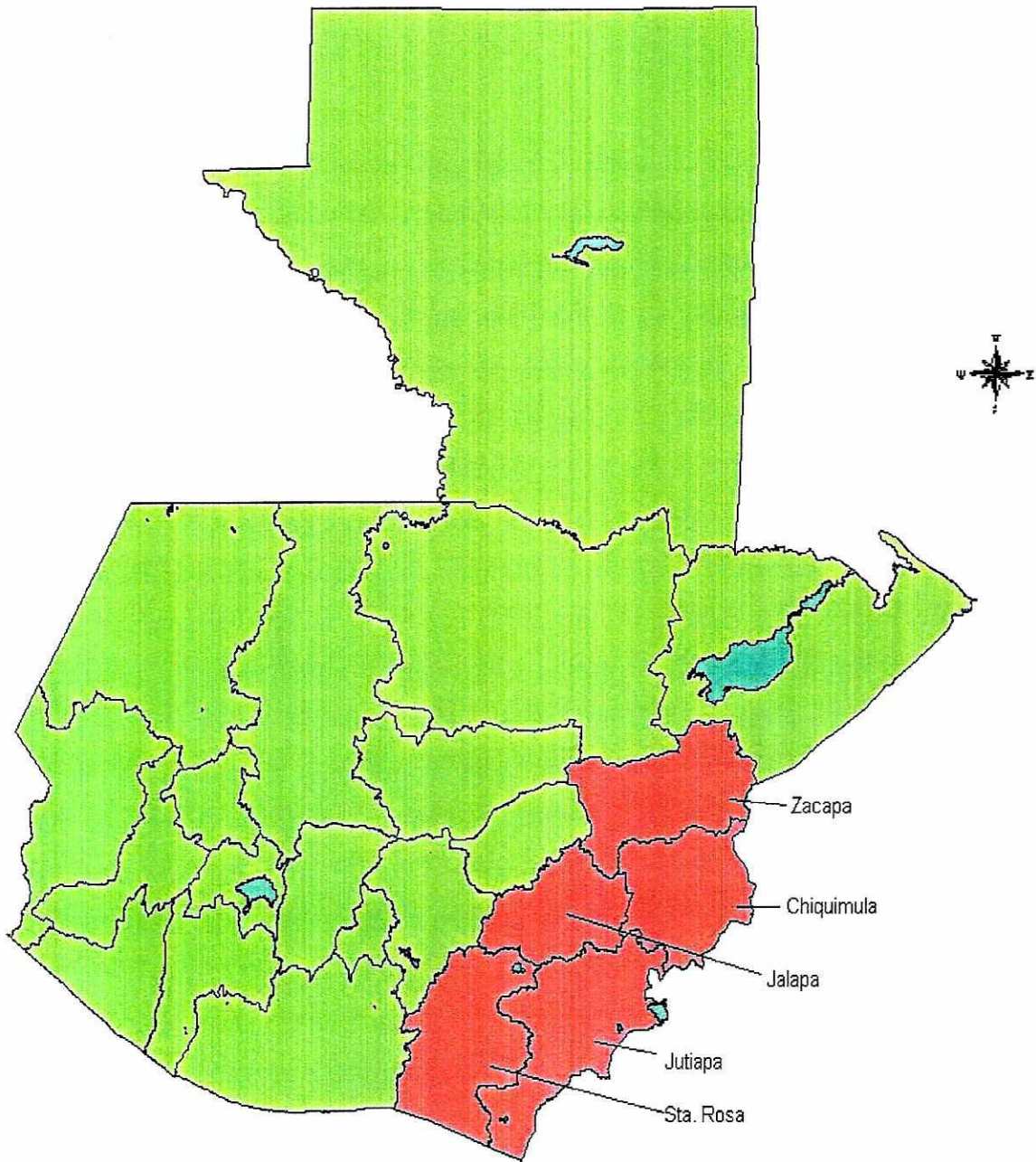
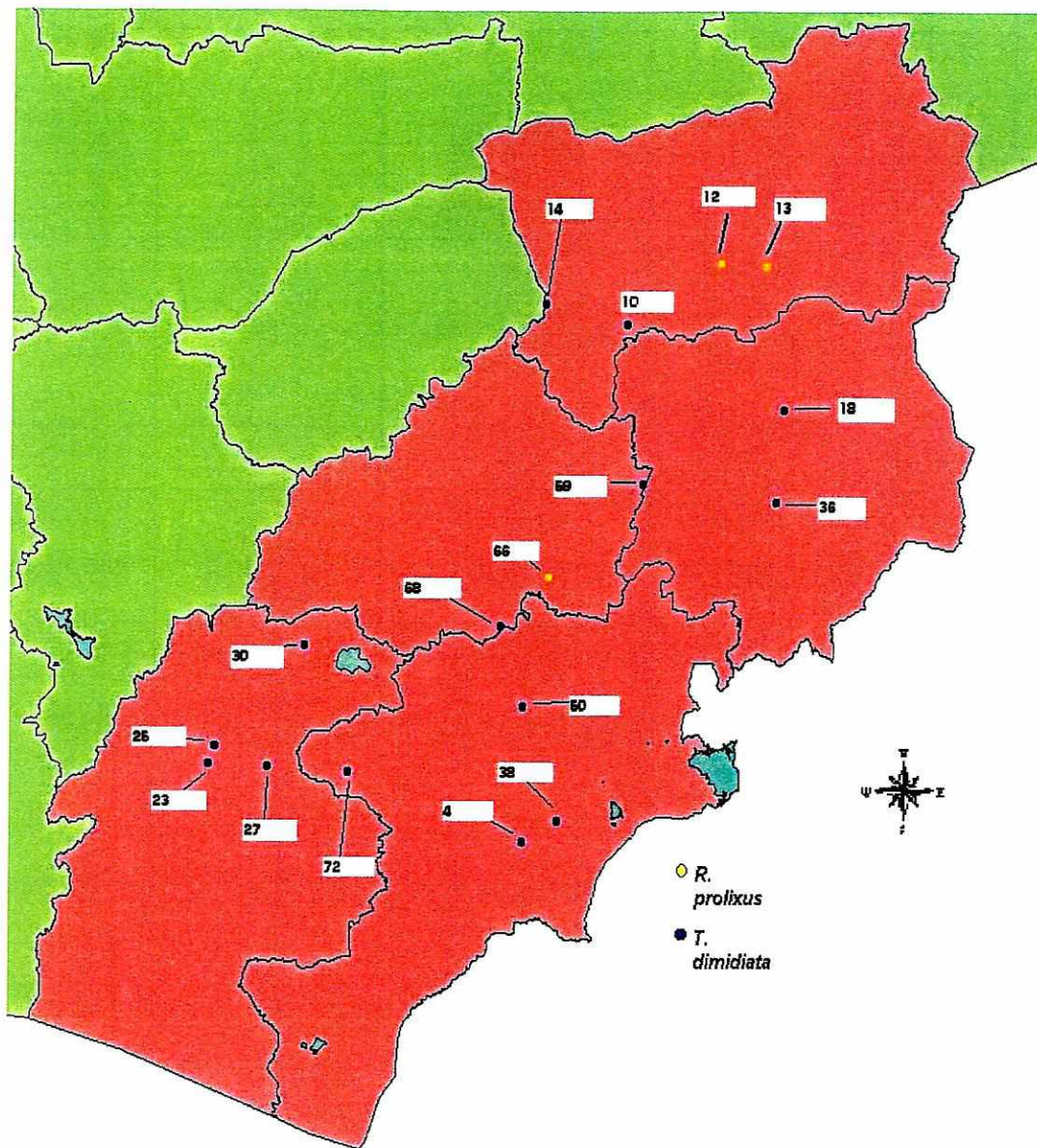


Figura 24
Distribución de los aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) analizados en los departamentos endémicos de Guatemala



Cuadro 4
Descripción de los aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) analizados

# aislado	ID*	Departamento	Localidad	Municipio	Especie
4	22-012-8	Jutiapa	Caserío Cerro de piedra	El Adelanto	<i>T. dimidiata</i>
10	19-111-10	Zacapa	San Miguel	Huité	<i>T. dimidiata</i>
12	19-131-24	Zacapa	Cerro grande	Zacapa	<i>R. prolixus</i>
13	19-132-5	Zacapa	Cerro grande	Zacapa	<i>R. prolixus</i>
14	19-110-1	Zacapa	El Guacamayo	Cabañas	<i>T. dimidiata</i>
18	20-095-16	Chiquimula	San Juan Ermita	Los Encuentros	<i>T. dimidiata</i>
23	6-015-12	Sta. Rosa	El pinito	Cuilapa	<i>T. dimidiata</i>
25	6-001-4	Sta. Rosa	Bijaques	Barberena	<i>T. dimidiata</i>
27	6-024-9	Sta. Rosa	San Juan de Arana	Cuilapa	<i>T. dimidiata</i>
30	6-060-8	Sta. Rosa	Estanzuela	San Rafael las Flores	<i>T. dimidiata</i>
36	20-159-10	Chiquimula	El Limón	Quezaltepeque	<i>T. dimidiata</i>
38	22-043-88	Jutiapa	La Perla	Yupiltepeque	<i>T. dimidiata</i>
50	22-154-139	Jutiapa	Morán	El progreso	<i>T. dimidiata</i>
59	21-045-12	Jalapa	San Felipe	San Luis Jilotepeque	<i>T. dimidiata</i>
66	21-067-22	Jalapa	Ventanas	San Manuel Chaparrón	<i>R. prolixus</i>
68	21-104-7	Jalapa	El Plash	Monjas	<i>T. dimidiata</i>
72	22-386-4	Jutiapa	El Tablón	San José Acatempa	<i>T. dimidiata</i>

* ID = identificación dada en el laboratorio de Control de Chagas del Centro de Estudios de Salud CDC-MERTU, Guatemala.

B. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias hipervariables del minicírculo.

Cada muestra de ADN total de *T. cruzi* se diluyó a una concentración tal que sólo se amplificó una banda de 330 pares de base (pb) después de realizar la reacción en cadena de la polimerasa con el oligonucleótido degenerado S35: 5'AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA 3' y el cebador S36 5'GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3' específicos para la región hipervariable del minicírculo (El oligonucleótido degenerado S35 y el cebador S36 descritos aquí son los mismos oligonucleótidos degenerado y cebador, respectivamente, descritos por Avila, *et. al.* (1990) y mencionados en los antecedentes). El ADN del minicírculo, contenido dentro del ADN total, sirvió como templado para la reacción en cadena de la polimerasa. Para este estudio se utilizó la Taq ADN polimerasa en solución amortiguadora de almacenaje B [Promega (Madison,

WI)]. Inicialmente se realizó un volumen de PCR de 15 μ L para optimizar la concentración de templado. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 0.04 μ L de ADN/ μ L de solución final de PCR, Solución amortiguadora de la Taq [a concentración final (c.f.) de 10mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1% tritón X-100, Promega (Madison, WI)], deoxinucleótidos trifosfatos a una c.f. de 0.8 mM, Taq ADN polimerasa a c.f. de 0.04 u/ μ L, y cada cebador: S35 y S36 a una c.f. de 0.4 μ mol/ μ L. Las reacciones se amplificaron por 30 ciclos, utilizando el termociclador Icycler (Biorad). Cada ciclo consistió en: 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridización a 64°C, y 50 s de elongación a 72°C. A eso se le agregó un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C y un paso final de elongación de 7 min a 72°C. Una alícuota de 5 μ L de cada muestra fue corrida en gel de agarosa al 2 % por 1 hr., a 8.5 V/cm, para verificar que se hubiera amplificado casi exclusivamente el fragmento de 330pb (ver figura 6). Una vez optimizada la concentración de cada muestra, se procedió a hacer la reacción en un volumen total de 100 μ L, para posterior purificación con las columnas Microcón PCR (Amicon) y resuspensión del producto de PCR en 30 μ L de agua destilada. Tanto antes, como después de purificar las muestras, se extrajo una alícuota de 5 μ L para correrla en agarosa al 2 %, por 1 hr., a 8.5V/cm.

C. Preparación de células electrocompetentes XL1-Blue (Invitrogen).

(Nota: todo el procedimiento se hizo en hielo y en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar). Se preparó un medio de cultivo sólido de *Luria Bertani*, LB (DIFCO, MI) que tenía tetraciclina a c.f. de 12.5 μ g/ μ L. Seguidamente, se hizo un cultivo de células XL1-Blue (Stratagene) en dicho medio, partiendo de células XL1Blue comerciales congeladas. Para hacer el cultivo se descongeló un poco las colonias de células XL1-blue y se raspó con un asa estéril. Las colonias de células se dispersaron por todo el medio (placa de LB + tetraciclina) tratando de aislarlas. La placa cultivada se dejó reposar por aproximadamente 10 min y posteriormente se incubó a 37°C, toda la noche, para que crecieran dichas células. Una vez ya crecidas las colonias de células, se prepararon 30 mL de caldo LB en un erlenmeyer aireado de 250 mL, y dos erlenmeyers

aireados de 1L, conteniendo cada uno 250 mL de caldo LB. Éstos fueron pasados por autoclave por 15 min. Cada caldo se dejó enfriar a temperatura ambiente (25°C aproximadamente) y se le agregó tetraciclina a c.f. de 12.5µg/µL. Del erlenmeyer que contenía 30 mL de caldo se extrajo una alícuota de 5 mL y se trasvasó a un tubo cónico de polipropileno estéril de 15 mL (el cual constituyó el blanco). La alícuota de 25 mL de caldo LB (que fue el precultivo) fue inoculada con una colonia de células XL1-Blue, obtenida de la placa de células previamente cultivada. Este precultivo líquido se dejó incubando toda la noche, a 37°C, con agitación constante a 225 revoluciones por minuto (rpm). Los erlenmeyers que contenían cada uno, 250 mL de caldo más tetraciclina se guardaron a temperatura ambiente (Invitrogen, 2000).

Al día siguiente, se inoculó cada uno de los 250 mL de caldo con 12.5 mL del precultivo y se colocaron a 37°C, con agitación constante a 225 rpm. Las células se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0.5-0.6, a 550 nm (OD₅₅₀ 0.5-0.6) cuando las células estaban en la fase media logarítmica. Los cultivos de células fueron transferidos a un frasco de la máquina centrifugadora de 600 mL (previamente enfriado) y se dejó el cultivo (500 mL) en hielo, por 30 min. Después, se centrifugó a 3500 rpm (aproximadamente 4000 x g), por 15 min., a 0°C (la máquina centrifugadora utilizada, Sorvall® RT7, era de baja velocidad y fue previamente enfriada). Se decantó el sobrenadante en un erlenmeyer para posterior desecho, y el precipitado, que estaba en el frasco de la máquina centrifugadora, se colocó en hielo. Se le agregó una alícuota de 100 mL de agua destilada estéril al precipitado y se mezcló bien para resuspenderlo. Se continuó agregando las mismas porciones de agua destilada hasta llegar a un volumen de 500 mL (Nota: siempre se mantuvo el frasco de la máquina centrifugadora en hielo). Se centrifugó a 3500 rpm, a 0°C, por 15 min. El rotor se mantuvo frío entre cada centrifugada. Se decantó el agua y se resuspendió el precipitado en 250 mL de agua destilada fría, autoclaveada. Se volvió a centrifugar a 3500 rpm, a 0°C, por 15 min. El frasco de la máquina centrifugadora se removió gentilmente y se decantó el agua. El frasco con el precipitado (células) se colocó en hielo y se resuspendieron dichas células en un volumen total de 20 mL de 10% glicerol frío y autoclaveado. Con una pipeta de 25 mL, pre-enfriada y estéril, las células resuspendidas fueron transferidas a un tubo cónico de polipropileno, preenfriado, de 50

mL. Dicho tubo se centrifugó a 5800 rpm, a 0°C, por 15 min. Se decantó el glicerol y se colocó el tubo inmediatamente en hielo. El precipitado fue resuspendido en 1 mL de 10% glicerol estéril y se agitó en una máquina de agitación “Vortex” (Fisher) a la velocidad máxima. El volumen final fue aproximadamente 2 mL. Siempre se mantuvo el tubo en hielo. Por último, se hicieron pequeñas porciones de 80µL de células, en cada tubo eppendorf de 1.5 mL previamente enfriado. Para conservar las células XL1-Blue electrocompetentes, se congelaron rápidamente “Flash freeze” en una piscina de etanol absoluto a -80°C y se dejaron guardadas, a esa temperatura, en cajas criogénicas. Aproximadamente, se obtuvieron 18 viales por 500 mL de cultivo de células (Invitrogen, 2000). La eficiencia de transformación esperada de las células electrocompetentes, obtenidas por este método, fue de 1×10^9 cfu/µg ADN (cfu significa unidades de colonias formadoras). Sin embargo la eficiencia de transformación obtenida en estas células fue de 1×10^6 debido a un error de calibración en la incubadora (temperatura más baja y velocidad de agitación menor) utilizada.

D. Clonación del fragmento de 330 pb de la región hipervariable del minicírculo.

Una vez purificada cada muestra se procedió a estimar su concentración en una gel de agarosa al 2% (*p/v*) utilizando como parámetros de cantidad de ADN los marcadores moleculares de 100pb [Promega (Madison, WI)] y de 1 kb (Gibco BRL). Con base en la concentración, se calculó el volumen del producto de PCR a agregar de cada muestra para ligarla al vector pGEMT-Easy [A1360, Promega (Madison, WI)] a una razón molar de inserto:vector de 3:1, con un volumen final de 10µL. Las condiciones de reacción de ligación fueron: solución amortiguadora de ligación rápida de T4 ADN ligasa a c.f. de 1X [Promega (Madison, WI)], vector pGEMT-Easy [Promega (Madison, WI)] a c.f. de 5ng/µL, volumen de producto de PCR necesario para obtener una razón de inserto:vector 3:1, ADN T4 ligasa a c.f. de 0.3 unidades Weiss/µL de reacción, volumen de agua destilada estéril necesario para aforar al volumen final de la reacción. Todas las reacciones fueron mezcladas por succión y expulsión de un volumen con micropipetas. Se corrió un control de fondo y un control positivo por cada lote de vector pGEMT-Easy

comercial utilizado. La ligación se dejó toda la noche a 4 °C y se inactivó a 70°C por 10 min. A esta reacción se le agregó 10 µL de agua y se precipitó con acetato de sodio 3M/etanol absoluto. Una vez limpio el producto de ligación, se transformaron las células electrocompetentes, XL1-Blue, con dicho producto. Todo el procedimiento de transformación se llevó a cabo en frío (bandeja con hielo) y se hizo de la siguiente manera: en una cubeta “cuvette” de 0.2 cm (Biorad), previamente fría, se colocó 1µL del producto ligado y 40 µL de células competentes. Se homogeneizó la muestra y se electroporó, en el electroporador Gene Pulser II, en conjunto con el Pulse Controller Plus (Biorad), con las siguientes condiciones: se usó el capacitor de baja capacidad de 25 µF, a 2.5 kV y 200 ohms (en el rango bajo). Después de la transformación, las células electroporadas fueron colocadas en 1mL de medio isotónico, SOC, para posterior incubación a 37°C, por 1 hr., a 225 rpm. Al terminar la incubación se plaquearon 50µL de las muestras en medio de cultivo LB que contenía: tetraciclina a c.f. de 12.5 µg/µL, carbenicilina o ampicilina a c.f. de 100 µg/mL, 0.8 mg de isopropil-1-tio-β-D-galactosidasa, IPTG, y 0.8 mg X-gal. Las placas se dejaron incubando, a 37°C, toda la noche y el stock de células transformadas se guardó a 4°C por una noche.

E. Almacenamiento de células transformadas.

Una vez observado que la cantidad de células transformadas en cada placa era adecuada, se procedió a guardar a largo plazo, el conjunto de células transformadas, según el protocolo de Hanahan: la transformación fue diluída 1:1 con 40% glicerol/ 60% medio SOB, previamente frío, y fue congelada rápidamente en un baño de etanol a – 80°C, almacenándola por tiempo indefinido (Hanahan, *et al.*, 1983).

F. Conteo y selección de colonias

Se hizo conteo de las colonias crecidas en las placas. Se obtuvo el porcentaje de colonias azules, blancas y celestes. De estas colonias se seleccionaron 15 al azar, que

eran blancas o celestes; no se escogieron azules debido a que estas no contenían el inserto, y con un palillo de dientes se hizo una copia de la colonia de células en otra placa de LB con tetraciclina, carbenicilina o ampicilina, IPTG y X-gal. Estas placas se incubaron, a 37°C, toda la noche para crecimiento bacteriano. Paralelamente, con el mismo palillo, de cada colonia se volvió a plaquear en medio sólido de LB con 25% glicerol, y carbenicilina o ampicilina, y fueron incubadas a 37°C toda la noche. Estos medios fueron congelados a -20°C para mantenerlos a largo plazo (hasta un año). Las placas sin glicerol fueron guardadas a 4°C.

G. Lisados de clones para amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Después de la incubación de las placas de selección de colonias, se procedió a hacer un lisado de las colonias clonadas seleccionadas. Para ello, las placas de selección, almacenadas a 4 °C, se dejaron a temperatura ambiente por 15 min. Luego, con un palillo de dientes estéril se escogió un conjunto de colonias de cada clon y se resuspendió en 50 µL de una solución Tris-EDTA, TE, pH 8.0 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Las colonias de bacterias de cada clon fueron lisadas con calor (se hirvieron por 15 min) y luego se almacenaron a -20°C, en un congelador sin escarcha. De cada lisado se usó 1µL para hacer PCR.

H. Diseño de oligos para tamizaje.

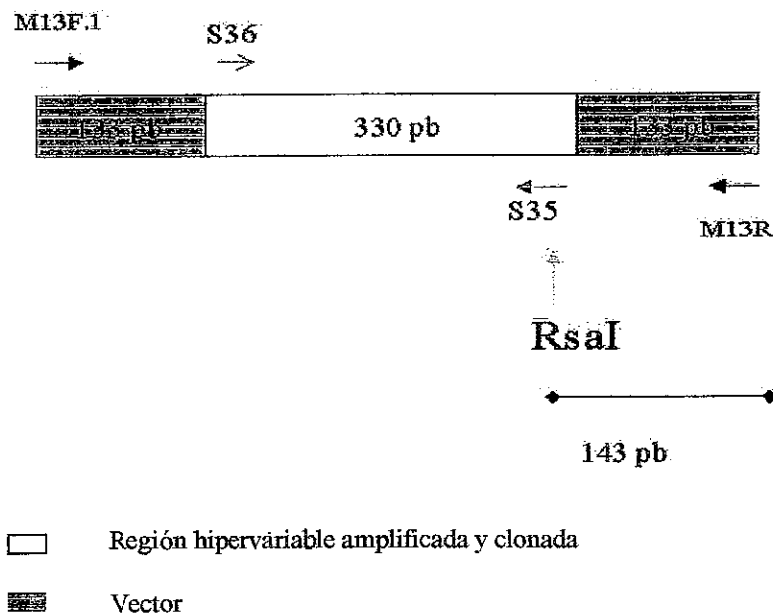
Como se había mencionado anteriormente, se utilizó el vector pGEMT-Easy [Promega (Madison, WI)] como vehículo para transportar el fragmento de ADN de 330 pb dentro de las células huésped XL-1Blue, para ser clonado dentro de las mismas células. Para verificar si se había insertado el fragmento de ADN deseado, se diseñó, en este estudio, una pareja de oligos o cebadores para tamizaje de manera tal que facilitaran el análisis por RFLP de la región hipervariable del minicírculo amplificada, clonada y secuenciada de los aislados de *T. cruzi*.

El diseño de estos óligos se basó en los siguientes requisitos:

- i) Que fueran específicos (localizados solamente una vez en el vector) y que no se hibridizaran con el inserto.
- ii) Que fueran Equidistantes hacia el inserto, para eliminar la variable de la orientación del mismo.
- iii) Que permitieran tener un control interno de digestión con la enzima *RsaI*; ya que el óligo degenerado S35, localizado en el fragmento de 330 pb, cuenta con un sitio de restricción para dicha enzima, dando como resultado un fragmento constante de 143 pb.
- iv) Que los fragmentos generados por RFLP tuvieran un tamaño mayor de 100 pb.

Para una mejor visualización de la localización de dichos óligos *vid* figura 25. Los óligos diseñados fueron: el “M13Forward.1” (M13F.1): 5’ GGT AAC GCC AGG GTT TT 3’ y el “M13Reverse” universal (M13R): 5’ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3’.

Figura 25
Diagrama de localización de óligos “M13Forward.1” (M13F.1)
y “M13Reverse” universal (M13R)



- I. Tamizaje de clones con los óligos “M13 Forward.1” (M13F.1) y “M13 Reverse” universal (M13R).

Con la pareja de óligos diseñados en este estudio se tamizaron, por medio de la técnica de PCR, cinco clones al azar de cada aislado. Como se había mencionado anteriormente los óligos M13F.1 y M13R se encuentran a los lados del inserto y amplifican un fragmento total de 596 pb, que incluye una parte del vector y el inserto (véase figura 24). El volumen de la reacción de PCR para tamizaje fue de 30 μ L, y se utilizó la Taq ADN polimerasa en solución amortiguadora de almacenaje B [Promega (Madison, WI)]. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 0.03 μ L ADN clon lisado/ μ L de volumen final de la reacción de PCR, solución amortiguadora de la Taq [a c.f. de 10mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1% tritón X-100, Promega (Madison, WI)], deoxinucleótidos a c.f. de 0.1mM, Taq ADN polimerasa a c.f. de 0.04 u/ μ L, y cada cebador, M13F.1 y M13R, a una c.f. de 0.4 μ mol/ μ L. Las reacciones se amplificaron por 35 ciclos, utilizando el termociclador Icyler (Biorad). Cada ciclo consistió en: 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridización a 45°C, y 1 min 30 s de elongación a 72°C. A eso se le agregó un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C y un paso final de elongación de 7 min a 72°C. Un volumen de 5 μ L de cada muestra se corrió en gel de agarosa al 2% por 1 hr., a 8.5 V/cm, para verificar la presencia del fragmento deseado (596 pb aproximadamente). Una vez obtenido el clon deseado, se procedió a hacer el análisis por RFLP y la secuenciación de dicho fragmento amplificado con los óligos M13F.1 y M13R.

- J. Análisis por el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima de restricción RSA I (Promega (Madison, WI)).

Los clones seleccionados fueron digeridos toda la noche con la enzima de restricción RSA I [Promega (Madison, WI)]. El volumen final de la reacción de digestión fue de 20 μ L y las condiciones de reacción fueron las siguientes: Solución amortiguadora C [a c.f. de 10mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, Promega (Madison, WI)], 0.5 μ L de ADN, amplificado con los cebadores

equidistantes, por μL de volumen final de reacción, *RsaI* a c.f de 0.1 u/ μL y agua para ajustar al volumen final. Paralelamente, se corrió un control negativo, que consistió en agregar lo mismo que la digestión sólo que sin enzima de restricción. Todas las reacciones de digestión se dejaron incubando a 37°C toda la noche. Posterior a la digestión, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida “polyacrilamide gel electrophoresis” (PAGE) de concentración constante de monómero de 8% y una razón de acrilamida:bis de 29:1. Las geles se corrieron en la cámara electroforética Miniprotean II cell (Biorad) a 4°C, por 1 hora 40 min, a 15 mA constantes, utilizando como fuente de poder la EC-600 (Aparatus Corporation). La solución amortiguadora de corrida fue 0.5X Tris borato ácido etiléndiaminotetracético (TBE). Las geles se tiñeron con plata, con base en el protocolo descrito por Black, *et al.* (1997). En cada pozo se montó 3 μL de muestra digerida, 2 μL de agua destilada estéril y 1 μL de 6X solución amortiguadora de montaje “6x Loading solución amortiguadora dye” [Promega (Madison, WI)]. Los marcadores o estándares de masa molecular utilizados fueron el de 100 pb y el de 25 pb [ambos de Promega (Madison, WI)]. La cantidad agregada de ambos estándares, en cada pozo, fue optimizada para todas las electroforesis realizadas en geles de acrilamida. En un extremo de la gel se agregó el marcador de 25 pb (1.5 μL de marcador de 25 pb, 4.5 μL de agua destilada estéril y 1 μL de solución amortiguadora de montaje 6X), y en el otro extremo de la gel se agregó el conjunto de marcadores de 100pb + 25 pb (1.5 μL de marcador de 25 pb, 1 μL de marcador de 100 pb, 3.5 μL de agua y 1 μL de solución amortiguadora de montaje 6X). Por último, el análisis de esquizodemos se hizo cualitativamente, observando los patrones de restricción con la enzima *RsaI* en las geles de acrilamida corridas. Paralelamente, se hizo una búsqueda de posibles sitios de restricción con las enzimas *TaqI*, *HinfI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, y *AluI*, de los clones secuenciados utilizando el software DNAsis (Hitachi Software Engineering Co. Ltd and Molecular Biology Insights, Inc of Cascade, Colorado).

- K. Determinación de la secuencia de los fragmentos de ADN amplificados con los oligos "M13 Forward.1" (M13F.1) y "M13 Reverse" universal (M13R).

Una vez identificados los clones deseados, se escogieron dos de cada aislado para determinar su secuencia. Para ello se amplificó el fragmento de 596 pb, por medio de la reacción de PCR, con los cebadores M13F.1 y M13R, como se había mencionado anteriormente, pero ahora con un volumen final de 20 μ L y utilizando 0.05 μ L ADN clon lisado/ μ L de volumen final de la reacción de PCR. Un volumen de 5 μ L del producto final de PCR de cada clon se corrió en gel de agarosa al 2 %, por 1 hr., a 8.5 V/cm para verificar la presencia del fragmento deseado (596 pb aproximadamente) y la ausencia de fragmentos no deseados. Los productos de PCR que contenían sólo el fragmento de 596 pb fueron purificados con las columnas Microcón PCR (Amicon), resuspendiendo el producto final en 15 μ L de TE 0.01M pH7.4. Del producto de PCR purificado, de cada clon, se hizo una dilución 1:10 en TE 0.01M pH7.4, con un volumen final de 10 μ L. Una vez hechas las diluciones, se realizaron dos reacciones de secuenciación, por producto de PCR de cada clon purificado, una con el oligo M13F.1 y otra con el oligo M13R. El volumen final de cada reacción de secuenciación fue de 20 μ L. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron las siguientes: 0.1 μ L del kit "Big Dye Terminator Ready Reaction Mix" (Perkin Elmer, Biosystems) por μ L de reacción, solución amortiguadora de secuenciación (a c.f. de 3mM de MgCl₂ y 120mM Tris pH9.0), el cebador a una c.f. de 0.5pmol/ μ L reacción, producto de PCR purificado a una c.f. de 1.5 ng/ μ L, y el volumen de agua ultra pura necesario para aforar al volumen final de reacción. Las reacciones se amplificaron por 25 ciclos, utilizando el termociclador 9600 (Perkin Elmer). Cada ciclo consistió en: 10 s. de desnaturalización a 96°C, 5 s de hibridización a 50°C y 4 min de elongación a 60°C. Por último, se le agregó un paso final de enfriamiento a 4°C por 10 min (tomando como precaución que a las reacciones de secuenciación no les diera luz). Una vez terminadas las reacciones de secuenciación, éstas fueron purificadas con las columnas CentriSeps [Princeton Separations (Adelphia, NJ)]. Los productos purificados de la reacción de secuenciación fueron secados al vacío, sin aplicar calor y, una vez completamente secos, se resuspendieron en 20 μ L de Hi-Di ,formamida (ABI Prism). Un volumen de 15 μ L, de cada una de las resuspensiones,

fueron colocadas en placas de secuenciación de 96 pozos (Micro Amp Optical Applied Biosystems (Foster City, Ca) y cubiertas con tapaderas de secuenciación (Septa Strip 96 Well tray (PE Biosystems)). Una vez cerrada la placa se realizó un paso previo de desnaturalización de las reacciones de secuenciación a 95°C por 3 min y luego se colocaron inmediatamente en hielo, por 2 min, para luego ser leídas por el secuenciador automático ABI prism 3,100 “automatic sequencer ABI 3,100”.

Las secuencias obtenidas de los clones fueron analizadas con el “Sequencing Analysis Software™ V. 3.7” y “Factura software” (ABI PRISM 3100) para determinar la secuencia consenso entre los cebadores “forward” y “reverse”. El “software” DNAsis (Hitachi Software Engineering Co. Ltd and Molecular Biology Insights, Inc of Cascade, Colorado) fue utilizado para:

- i) Hacer alineaciones múltiples de secuencias, en base al método de alineación de secuencia progresivo descrito por Higgins-Sharpe.
- ii) Realizar un análisis de similitud, entre secuencias de ADN de los clones seleccionados, utilizando el algoritmo de Lipman-Pearson.
- iii) Determinar el porcentaje de bases en las secuencias de los clones seleccionados.
- iv) Encontrar cuadros de lectura abiertos en las secuencias analizadas.

Los parámetros utilizados para cada una de estas últimas cuatro aplicaciones se describen en la sección de resultados.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- A. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y desarrollo de la metodología para la clonación de la región hipervariable del minicírculo del ADN total, de aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

Inicialmente, en las condiciones en que fueron corridas las reacciones de PCR, con el par de iniciadores S35 y S36, además del fragmento de 330 pb se amplificaba un fragmento de ADN de 780 pb, el cual incluía dos regiones hipervariables del minicírculo y una región conservada (*vid* figura 7 y figura 26). Por lo tanto se recurrió a diluir el templado de ADN total extraído de *T. cruzi*, hasta que en las geles de agarosa al 2% no se observara el fragmento de 780 pb, sino que sólo el de 330 pb (*vid* figura 27). Esto fue satisfactorio para cada aislado analizado, ya que la pareja de iniciadores amplificó en mayor escala el fragmento de 330 pb perteneciente a la región hipervariable del minicírculo.

Al mismo tiempo, dos muestras catalogadas inicialmente, por medio de la técnica de microscopía de luz, como *T. cruzi* fueron amplificadas con la pareja de oligos S35 y S36 y se encontró que eran muestras de *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*), dado que la banda esperada de la región hipervariable del minicírculo era de aproximadamente 400 pb, que es lo esperado para dicho parásito (*vid* figura 26). Esto demuestra que la región conservada del minicírculo se mantiene entre aislados de distintas especies de *Trypanosoma*; y entre distintos aislados de *T. cruzi* sin importar su origen geográfico, ni el hospedero de donde provengan. Esto se puede corroborar con base en estudios anteriores donde se utilizan otros aislados y cepas de distintos países como Brasil, Venezuela, y Costa Rica, entre otros (e.g. Avila, *et al.*, 1990)

Estudios preliminares de digestión, con la enzima de restricción RsaI, de productos de PCR no clonados mostraron patrones de restricción complejos de analizar. Se observó que fragmentos de restricción menores de 100 pb eran muy difíciles, si no es que no se podían visualizar en distintos tipos de geles. Se trató de utilizar agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, acrilamida en gradiente del 5-15%, acrilamida con monómero constante del 10% y acrilamida con monómero constante del 8%, teñidas con plata para poder visualizar los fragmentos pequeños (<100 pb). Sin embargo, no fue satisfactorio el resultado.

Otros estudios preliminares de digestión de productos de PCR no clonados, sólo que ahora utilizando las enzimas de restricción TaqI, HinfI, Sau3AI, HaeIII, EcoRV [donde las tres primeras enzimas eran de Promega, (Madison, WI), y las restantes eran de Boehringer Mannheim], mostraron que algunas de las regiones hipervariables del minicírculo no contenían dichos sitios de restricción. Además se encontró que el oligonucleótido S36 contenía un sitio de restricción para la enzima TaqI, produciendo fragmentos de 6 pb, que no fueron posibles de visualizar (resultados no mostrados).

A partir de estas pruebas, se decidió clonar los fragmentos de 330 pb, ya que representan una ventaja para el análisis de secuencia y RFLP. Una vez amplificada y purificada la región hipervariable del minicírculo del ADN total de aislados de *T. cruzi*, se clonó en el vector pGEMT-Easy, utilizando para la transformación células electrocompetentes XL1-Blue. Con esta metodología de clonación se asegura el estudio del fragmento deseado, sin contaminación alguna y permite visualizar mejor los fragmentos de restricción en geles de poliacrilamida, teñidas con plata.

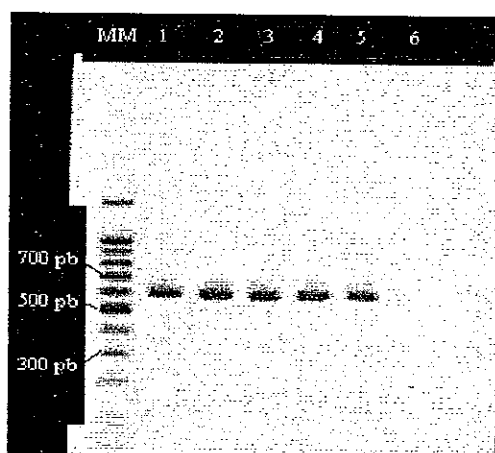
Para escoger las enzimas de restricción que digirieran el producto de PCR clonado se tomaron en consideración los siguientes requisitos:

- i) Que no cortaran el vector: ya que iba a ser muy difícil determinar si los fragmentos de restricción visualizados se debían al ADN insertado o al vector.
- ii) Que cortaran el ADN insertado.

De todas las enzimas mencionadas arriba sólo la *RsaI*, cumplió con dichos requisitos, razón por la cual únicamente se utilizó esta enzima.

Durante el tamizaje de los clones se obtuvo el producto específico esperado de 596 pb amplificado con la pareja de oligos M13F.1 y M13R diseñados en el laboratorio (*vid* figura 28). Este diseño de oligos presentó la ventaja de que era innecesario determinar la orientación del inserto en el vector, a menos que se requiriera, ya que los iniciadores son equidistantes a dicho inserto.

Figura 28
Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento de 596 pb con los cebadores "M13Forward.1" (M13F.1) y "M13Reverse" (M13R) de los clones seleccionados



El pozo MM es el estándar molecular de 100 pb. A continuación se muestran la banda de 596 pb para los clones del aislado 23 Pozo 1) clon 32, 2) clon 33, 3) clon 35, 4) clon 36, 5) clon 49, 6) control negativo. Los productos fueron separados en una gel de agarosa al 2%, por 1 hr., a 8.5V/cm y teñida con bromuro de etidio

B. Secuencias de la regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de algunos de los clones obtenidos de los aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

A continuación se muestran las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del kDNA de los clones secuenciados con el secuenciador automático ABI 3100 y analizadas con el "software" DNAsis (Hitachi). (Nota: Estas secuencias también se encuentran publicadas en GenBank™ con los siguientes números de acceso: AY169974 - AY170007). El código dado es el siguiente:

- aislado-clon-vector departamento. Por ejemplo:
 - aislado: 12
 - clon: 10
 - Vector de donde se obtuvo: *Rhodnius prolixus*
 - Departamento donde se recolectó el vector: Zacaca

Se escribe de la siguiente forma: 12-10Rza.

Todas las secuencias estan escritas en orientación 5' - 3'. No incluyen los cebadores S35 ni S36, ni los cebadores M13F.1 ni M13R.

Jutiapa = jut

Zacapa = za

Santa Rosa = ro

Chiquimula = ch = chi

Jalapa = ja

D = *T. dimidiata*

R = *R. prolixus*

4-5Djut (280 pb)

5'

```

AATATAGTAC CTGTGGTGGT GAGcTGTGTG TAATGGTAGA TGGTATTGTT ACAGTAGATT
GATAGTTGTG TAGGCTTAGA TTGTATTGTT ATGAATGTAT GTTAAACTGA AACATGAGTT
AGAAGGTGAA AGTGGTTGAT ACATTTTAAT TGTTTATGTT GATGATTATT TAGTTGTATA
TGTATAGTAT ATATTTGATC TGGTAGTTCT TGGTAAAATG TGGTCACGGA GAAATAAGAA
TTTTGTTTTG GGAGGGGCGT TCAAATTTGG GGGCGAAAAT                                     3'

```

4-6Djut (281 pb)

5'

```

AATATAGCAT GGGATTTGGG ATTATGGTTT TGATTTGGTA ATGTGTGAAT GATAGTAGTG
ATGTTGTTAG ATCGTTTATG TTCTAGTGGT AGGAGTGTGT AGTGAAGATT TGTTATTTGT
TGTTGTATGT AGTTCTGTTA TGTAGTATAA TATATTATTG AGCAATGGTA GGAGGTTGAT
GTFGATAGGT GGTGATAAGT TGCTGTAAGT TGTA AAAATA GGGTTGGAAA TTATCTGGAA
ACTTGGTTTT GGGAGGGGCG TTCAACTTTT GGGCCAGAA T                                     3'

```

13-15Rza (285 pb)

5'
 AATATAGATA TTGGTTATCA GATGATTAAT TTTTATTTTG AGTTATGAAG TATTTGGTGT
 GGTATGTGAC CGAAGTAAGT TGTAGAAGAG AGGTAGAGGT GTAGATTACA TTGTTACTGT
 ATTTGATTCT TAGTTATGAT ATCTTTATAA ATTTGTTTATG GTAGTTATTG TGTTGGGGAT
 GGTAGGTATA TGGTATGTGG TTAAGCTGGT TATAGGTTAT ATTTTGATTT GGAAATTTCT
 GGAACTTGTG TTTTGGGAGG GGCCTTCAAA TTTGGGGCCG AAAAT 3'

14-3Dza (282 pb)

5'
 AATATAGGGG TTGTGCAGGT GATGTTAATT TTGGATAGTT ATTGATTGGG TATATTGATT
 TGATTGCGTA CATGATTGAA TACGATAGAT GGGGGTATGT GATAGTTAGT TTGATATTCT
 TTTATTTGTT GTTGAGTAAG AATATGTTAT AATGTGTTGG CTAGATAAAA CGGTTACTGT
 AGGTTTGAAT TGTTTTGTGT TTGGTAGATA AGGTAATTTG TAGAGGTAAA AAATTCAGAA
 ATTTTGATTT TGGGAGGGCC GTTCAACTTT CAGGGCCCAA TT 3'

14-7Dza (282 pb)

5'
 AATATAGAGG ATGGGTAGGA TTTGGATTAG TATTAGATTA TTAATTTTGA TTGAGTACAT
 GTTATAGAGT GTGGCAGACT CTTGTATACT ATTGTTTGTG TGCAGTTGAA TAGTGAATAC
 ATTAATTTAG TGTATATCTG TTATATGATA GTTACGATAT TTATTTGATT ATATAGGTTT
 GGTTAGTCA CTAGTAAAAG TTTGTTTTCG GCTTAAAATA GGGTATGGAA TTTTCGAGGA
 AATTTGATTT TGGGAGGGCC GTTCAAATTT GGGACCCGAT TT 3'

18-1Dchi (277 pb)

5'
 AATATAGCGG TTGTACTTGG ATTGGAATTA ATGGTTGTGA TTTAGTATTG TGTTATGAAG
 TGTAAGGTAT GTATGATTAG ATAGTGTGCT GTGAAAGAAT AGTGAAGAGA GTGAGTAGAG
 TTTCTTTGTT TATGTTAGTA GATCATTGTT ATACTTTTAG TTATAATATA ATATGAGGGG
 TTAAAGGTTT AAGGTGGGTG TTGTGGATAC TTATGGGTTA TAAATTTTTC GGGAAAGTCT
 GGTTTTGGGA GGGCCGTTC AATTTGGGGC CGGAATT 3'

18-4Dchi (280 pb)

5'
 AATATAGGTT CGGGTGCTTA GGGTTAGGGG TAGTAACAGA ATTTATTATT GTGAGTAGAT
 CGTATAGTTA TGATTAGTTT ATATAAGTGT GTATTCTTTG TATGGTTGAA GTGAATATGT
 TTAGTGGTAT GTTCTTATTG ATTGTTGAGT GAAGATGGAA ATTTTGTTAT GGATAAGAAT
 GATATTGTTG TTGTATTCTT AAACTGTGT AAATAAGTGG GTACGGAAAA TTCGGAAAAT
 CCGGTTTTTG GGAGGGGCGT TCAAATTTCA GGGCCTAAAT 3'

23-32Dro (276 pb)

5'
 AATATAGGCT AAGTCTTATT TCTGAATTTG TGGTATTGTG TATTTATGAA TGTTAGTAAC
 GAAATGAGTT GATTAGTAGA GTTTGTTTGG TAGGATTTGT TTTATGTACG TTGATTAGAT
 TTGAATGTAT TAAGTATATA TGTTTGTAAG AGGGTATGAT ATAGGTATGG TATAGGTGGT
 TATATTCTGA ATTGTTGATA ATTTGTTATA ATAGGTAGGT CAGAAATTCG GTAAACTTTG
 ATTTTGGGAG GGGCGTTCAA ATTTGGACCT GCAAAA 3'

23-36Dro (274 pb)

5'

AATATACAGT GTGGTATAGA TGAGTGTGAG TGTTATTTTC ATTTGATTGA TAGAGTGTAG
 TAATGTTGTG ATATACTGTG GTGATAAGAA TAGACATGGA TTAGTAAGTG AGTATAGATT
 ATTCTGTTAT AGTTTGTTTT GTTGCTACTG TTATACTGTT CATTCAATTT AGAGGTATGA
 TAAGGTAGTA TAGGTTTATT TTTGGTACGC TTATGATCCT GAAAATGCAG AAAACTCGGT
 TTTGGGAGGG GCGTTCAAAT TTGGGGCCGC AATT 3'

25-12Dro (277 pb)

5'

AATATAGTAT TGGTAcTACC TGAGTATTGT TTGGATTAGT TTAGGATTTG ATTTAGAPTG
 TGTAATGTTA GAGGTATCAA CGGTGA AAAAG TTTTGTGACA GTGGATTATA GAATGTATGT
 TATGTATTAT GTTATTGATT TGTGTTATTA TATAATGCTA TAAATCGTTG GTATGGTGGT
 GTAAGGTAGT GGTTTAGGTT GCTTGAGTAG AAAATAGGGT TAGAAAAATT CCGGAAACTC
 TGATTTGGGA GGGCGTTCA AATTTGGGAC CCAAAT 3'

27-26Dro (276 pb)

5'

AATATAGGAA TTGTTATGGT GTGTTTATTT CGATAATTTA GATTTGTATA TTGTGATTTG
 TTAGAGATGA GGTTAGTGGT GAGTAGTAGA TAGATTGTTA GTGAGTTATG ATACATTGAT
 TTGATAGATA ACTACGTTAA ATGTTATAAT GGTATAGGTG GGTGATAGGA TACATGGTAG
 GTTTGTAGTA GGTGCTTCC GTTTGTTATA GGTGAGGTT ATAATTTTGT GGAAAGTTAG
 GTTTTGGGAG GGGCGTTCAA CTTTTGGGTC CGGATT 3'

27-27Dro (286 pb)

5'

AAcTATAAGC TGGATGGTAT TGTTAcTTTT TGTTAGTTAG AATTGGTcTA GTGTAGATTA
 TGACATGTGT TATGTACAAG cTTTGAATTC GTGATAGGAT AGTATAGAGT TGAATTACTA
 TGTTTTAGTT TGTTATGTTT GAATGTATGT ATATACTTTG TATGGTAAGA TTATGGGTGG
 GTTGTGGATT GGTTAAGGTG AGATTGTTGG GCTGACAGAT ATTTGAAGGT TAAATTTcG
 TGATTTCTTG GTTTTGGGAG GGGCGTTCAG ATTTGGGGCC GCAAAA 3'

30-24Dro (282 pb)

5'

AACTATAGCA TACTAGGCTT GTGTATTAAT AAATTTGAAT TGTGACTAGA ATGTGGTGAG
 GATAGGATAC AGCAGAGGAG TATGTTTTAA AATGTGTGGT AGATTGTGTG AGTTGATGTA
 TGAAGAGTAT ATATGTTATA GTTTATGTTT ATTAAGTGTG TGGTTGTTGA TTA CTGTGAT
 GTGTGGTGTG GTAGTATTTG TTTTGTATT GGTGGATTTT GGTACTAAAA ATTTCTGGGA
 ATTTTGGTTT TGGGAGGGGT GTTCAGATTT TGGGCGGAAA AT 3'

30-25Dro (268 pb)

5'

AATATAGGAA GTTTAAAGcT TATGGTTTTAA TAGTTTATAT CAGATcTTGA AATGGTTGAT
 GATTGTGAGT GAAGTTATAA CGTCAAGTGG AGAGTAGATT GTACAGTTTG GTTTGATTTA
 TTTGATTTAT TCTGATTTAT TATATTATGT ATTATTATGA ATATGTTAGG GTGTATTGGT
 TGTTTGTGGG TTTGTAACAT AAAATGGTGG GTTAGAAAAA CTGGAAATTT GTGTTTGGG
 AGGGCGCTTC AAATTTGGGG CCCGAAAT 3'

36-33Dchi (274 pb)

5'
 AATATAGCAC TGTGTTGGT TTATGGATT GATAAAGGCG TGGTGGTTAT TATGATGTAG
 TGTACTATTG AGGTTGTGCT GATAGAGAGT GGATTAGTTG TAGATTTGTG ATGTTAATTT
 ATTCATGATA CATTAATAGA TTGTTTCTTA ACTTATGTAT GAGGGTAGGT GTGGTAGACT
 AGGTGTATGG TGTGGTATTG ATTAATACTT GAGGTGATAA AATTTATGGG GGAAGTTGAT
 TTTGGGAGGG GCGTTCAAAT TTATGGCGGA AAAT 3'

36-35Dchi (276 pb)

5'
 AATATAGGTA TTGGTGGGTG TAGGTGGGAT AAGTTGATGT TGTAGATGGT TGGTGAATCG
 ATGTGTTAAG TTGTTTTATT GTGGTATAGA GTGTTTGATA TTATGTTGAT TGTGTACGTA
 TTAAGTTTTT CGTTGGTGGG TGGAGTGATA GTATAAGTTA TGTTTGTCTT GAATGTTGGT
 GTTGTAAGAG TTGGATCATA GAATGTTGGT TAAGTGGGTT TGGAAAATTG TGGAGGGTTG
 GTTTTGGGAG GGGCGTTCAA CTTTTGGGGC GGAAAT 3'

38-31Djut (281 pb)

5'
 AATATAACCA GTGTGTGGCT TAGGGTTGGG CTTGCTTATA GATGTTATTG TATGTTTGTT
 GCGTCTGGAT GTGTTATTCT TAGTTATGTA GTTATGTAGT TCATTATTCA TTCACCACAT
 AGTATTATAT AAATTATATT CATAATTTTC TTATAATGTT ATGTTATATA GTTTGTTGTT
 TATTATATAT GATATCGGTA CGTCTTGTAAC GGGTAAGAGT GGGTTCGAAA AATTGCGGAA
 ATTTGGTTTT GGGAGGGGCG TTCAAATTTG GGGCCGAAAA A 3'

38-32Djut (281 pb)

5'
 AATACAGCAT GTAGATGGTA TTTAAAGTTG AGTATAGGTT TGATATGTTA GAGGTGTGTA
 TTGTATTGTG TGATGTATGT TGATCATAGT ACAGGATAGT AACGATGAGG AACTTAAAGT
 TATAGTTGAT TCTGTGTGTA ATGTTAGTAG TTGTTTATGT TTGTATAAGT TGATGTAGGT
 AGGGTAGTTG TTAGATGGTT ACCGGTTATT CTAATAATTTG GGGTTCAGAA ATTCGTGAAA
 GTCTGGTTTT GGGAGGGGCG TTCAAATTTG GGACCGCAAA A 3'

50-2Djut (287 pb)

5'
 AATATATACG TTATGCATGC AACGGTAGAA TTGAGTTAAT GGTGTTTTGG GTATGTGTAG
 ATAAAGTTGT AGATTGTATG TGTGAGGTGT AATGTTTATG TGAGGTGTTG TATATGGTTA
 GTTAGAGTGT TACTGAGTGT ATTTGTGTTT GATAGTACAG TAAGTTTGTA GGTATAGTTT
 GTTATTTGCT GTTGTGGTTA TAGTTATGTG GTATGGTGCA AGTTAGGGGT CAGAAATTTA
 CGGAAATCT GGTTTTGGGA GGGCGTTCA GATTTTGCC GGAAAT 3'

50-3Djut (286 pb)

5'
 AATATAGAGT GAGTTATGGA TGGGAGGTAA GTTATGTACT TTGATTCTTA TGTTTATTGT
 TTGTTTAGTT GTGTTTGGTA TCATTGTGTA TATAGTTTGG GTTGTGTGAG GACGTGAGAA
 GTGGTTATTA TAGTGTGATA GATTATAGTA TTTAATTTGT ACTTTATAGT TCTTATCCAT
 TAATCATATT ATAACATAAA TTCTTGTACT GGTGGTGGT AAAGGTGGTT GAAGATTTCT
 GGAAATACCG GTTTTGGGAG GGGCGTTCAA CTTTTGGGGC CAGAAT 3'

59-11Dja (270 pb)

5'
 AATATAAGGT AGATTGGTAG TTAATGCTTT ATTTATTATT GTGTATATAT TTGTGATATT
 AGTATGAGAC GGATGAGAGA AGTGTTTGTG GAGTTGTTAT CGATTGTTTG TTTGTTGATT
 ATTATGTTAT TGTATATGTT ATACTATTAT TTATGTTGTG GGGTTGTAGG TGGTGTATGG
 TTGCTGTGGT TATTGGTACA TGGTAAAATT GGTACGGAAA TTCTGGGAAA GTTAGTTTTG
 GGAGGGGCGT TCAACTTTTG GGGTCAGATT 3'

59-17Dja (279 pb)

5'
 AATATAGACT TGGGTGTGGT GATAGAGTAT AGGTGTAGGA ATTTATATGA TAGTTTTAGT
 GAGTGTATTA TAGTGATGGT ATAGAGGATG TGATGTAGTA TGAGTTAGAA TGCGAGATAG
 AAATTTTGTG TAGATTGTTT ATGTTACCTA ATGTTTGTTA TCTAAGGTTG AATGGTATGT
 ATGTTGATAG TGTGCTGGTT TGGAGTATGT GGTAAGGTTA AGGGTTAAAA ATTTCCGAAG
 CCTGGTTTTG GGAGGGGCGT TCAACTTTTG GGTCCGATTT 3'

66-22Rja (270 pb)

5'
 AATATAAGGA ATTGTTTATG ATGATTTAGA GTATTGATTT GTTTGAATAT GTTTATAGTA
 GAGTGTGGCA GACTCTTATG TACTAGTTTG TATGCAGTGT GTTGTAGTAT AGTTGTAATT
 GTGGCGTGTA TATACTTTGA TCTATGTTAT ATATTATTTG TTAATTATGA TTGTATAGGT
 AGTGGATGGT TGTAAGTGAG GTGGAAATGG TGTGTAAAAT TTTGAGAAAC TTGTGTTTAG
 GGAGGGGCGT TCAAATTTGG GGGCGAAAAT 3'

66-23Rja (279 pb)

5'
 AATATAGAGC GTGGATTATG ATGGTGAGAT AATGTTGATA TAGTTTGATt ATTTGTTATT
 ATAGTTTTAA TTGTATTGAA GTTGTAGCTT AGACATATAA CAGAGAACAA ATGGTAGTAG
 TGAAGATAGA TTTTGTGAGT TGTATAAAGA TAGTATGTTA TAGTTTATTC ATTATTAAGA
 TACTAGTGGG GATAAGTGT GCATGTTAGG TTAATGTTGA GGTGAAAAT GCTTTGGGTT
 TGTTTTTTGG GAGGGGCGTT CAACTTTCCG GGGCCAAAT 3'

68-43Dja (271 pb)

5'
 AATATAGGAT TAGTACGGTg AGTgAAGGTT ATAtGTTGtA TGTTGATGAC AGTTGtATAT
 TCAAGACATA AAGATGGTAG GTGTTTGTG TAGTGAATGT TATAGTTTGT CGTGTAAAGT
 TTGTAAGTTG GTGTTAAACT GTATTATATT GTTTATTGGT TGGTGTAGT TGGGTGGTG
 CTATGTTTGT GTGGTATTGC TGTAATTTGT GGTATTAAAA ATTTCCGAGAA ACCTGGTTTT
 GGGAGGGGCG TCAACTTTT GGGGCCGGA T 3'

68-44Dja (272 pb)

5'
 AaTATaAGGG CAGTGGTATA ATATtATTAA GATGGTAtTA GTATGTTATA GTTTGTtTCC
 TGTATTAGTG AATGTAGTTT CAACAAGAGG AGGTTAGTGA AGAGTTAGTT AGTAAGTGAA
 TGATGTGTTA TTAATGTTGA TAAGTATATT AAGTTTATAA ATGTTCCCTAT AACTGTGTGG
 ATGGGTTGTA TAGGTTTTGA TGGTAAAAT GAGGTGCGGA AATTTCCAGA AAGCTGATTT
 TGGGAGGGGC GTTCAAATTT GGGGCCGCAA AT 3'

72-2Djut (275 pb)

5'

AATATAGGCT TGGGTTATAG GTTGGATATA ATGGTGTAT AATGTAGTTT AGTTATGTCT
 TTAGTTTGAG TATGGTAGTA TTGATGTGTA GTATGTAACA TAAAGTTGTA TAGAGTGGTG
 AGCAGTACAT GATTATATAC TTAGAGTTAT TGTTAAGAGT ATAGTTTAGA ACATTAATGA
 TTACGTTACT GGTTCGTTA TTATGGTGGG AATGGGTATC GGAAATTTGT GGAAGTCTGG
 TTTTGGGAGG GCGTTC AAC TTTTGGGCCG CAAAT 3'

72-3Djut (278 pb)

5'

AATATAGTGT GGGGCTATAG GTGTTGTTGA ATGGTGTAGT GAGTTTTGAT TGTATGTGTA
 TTATGTGTGT TATAATTTGAT ATCGATGTGT GCATGACAAA GGAATGAGAA AGAGTTGAGT
 AAGGTTTTGT TAGTTTGAGA GTGATGAATT ATTTAATAAC TATAATTGTT TGAATATGTA
 TACAGTGGTT TGGTTATTGG GTGTTGCGGT TAAAATGGTG AGTTGGAAAA TTGTGGAATC
 TAGTTTTGGG AGGGGCGTTC AACTTTTTGGG GGCCAAAT 3'

- C. Análisis de la región hipervariable del ADN cinetolpalsto (kDNA) del minicírculo por el método de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y búsqueda de posibles sitios de restricción

1. Desarrollo de metodología para la corrección del error de migración

Como se había mencionado anteriormente, los productos de PCR de 596 pb fueron digeridos únicamente con la enzima de restricción RsaI y los fragmentos obtenidos fueron separados en geles de acrilamida al 8%. Una desventaja del estudio de RFLP es que todas las electroforesis realizadas deben tener las mismas condiciones de corrida, las cuales están sujetas a varias fuentes de error. En este estudio se trató de optimizar la técnica de RFLP en una cámara electroforética Mini Protean Cell II (Biorad) corrida en frío a 15 mA constante, y utilizando como buffer de corrida 0.5X TBE.

Los marcadores de masa molecular utilizados fueron el de 25 pb y una combinación del marcador de 100 pb con el de 25 pb, permitiendo cubrir un rango de 50-400 pb. Dado que en la técnica de RFLP, por condiciones de corrida, puede que varíe o no la migración de fragmentos de igual masa molecular entre geles, se diseñó un control interno como medida de corrección del error de migración de fragmentos. Este control interno se basó en el sitio de restricción localizado en el oligonucleótido degenerado S35, donde se generó un fragmento constante de 143 pb. El control interno fue obtenido para la mayoría de los clones digeridos, a excepción del clon 25 del aislado 30, del clon 22 del aislado 66, y del clon 44 del aislado 68. Estos casos, donde no hay sitio de restricción en el oligonucleótido degenerado, sugieren que el error provino de la replicación del vector después de electroporado.

Con base en las electroforesis realizadas en acrilamida, de los distintos aislados, bajo las mismas condiciones de corrida, se observó que la migración de los marcadores de masa molecular varió hasta un 4% entre cada gel. Esto se tradujo en una variación en la estimación de la masa molecular desconocida de los fragmentos obtenidos por digestión con la enzima RsaI (referirse al apéndice para profundizar en la migración de los

marcadores de masa molecular). Esta variación tuvo un rango de 1-10 pb, lo que indicó que para fragmentos grandes no afectó tanto pero para fragmentos pequeños, < 200 pb, fue una diferencia significativa.

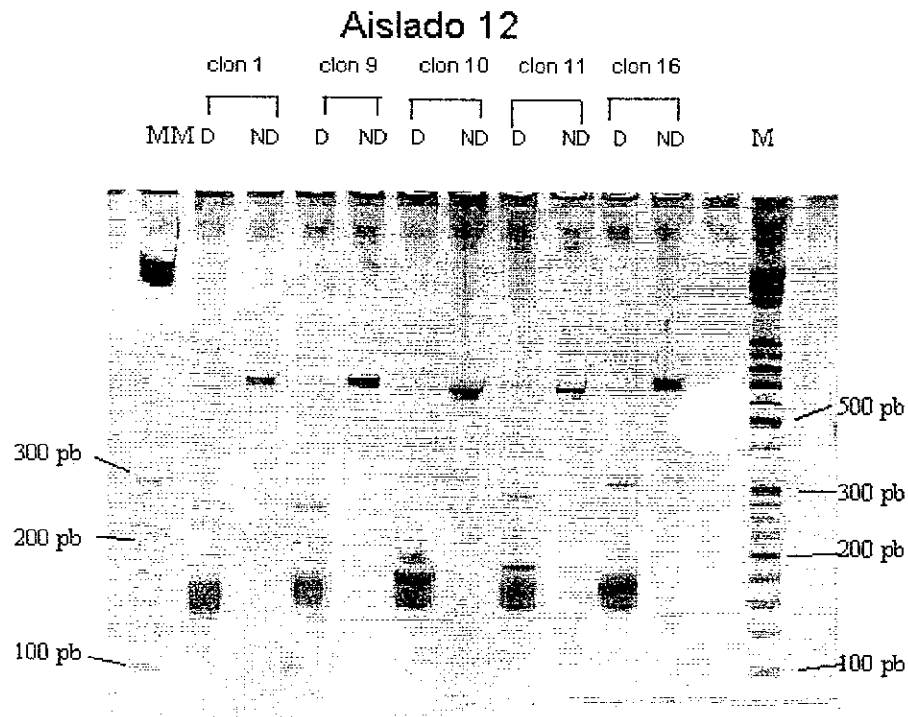
También se pudo observar que la desviación estandar de la migración media de los marcadores de masa molecular utilizados en dichas geles muestra que el rango lineal de separación fue entre 200 y 300 pb, mientras que para fragmentos menores de 200 pb el rango no fue lineal (*vid* cuadro 22 y figura 29). La desviación estándar de migración de estos fragmentos pequeños aumentó conforme más pequeñas eran las bandas. Esto apoya los resultados sobre la variación en la estimación de la masa molecular de las bandas desconocidas. Por ende, se concluyó que una concentración constante de monómero de la gel al 8 % no es lineal para el rango de fragmentos < 200pb, bajo las condiciones de corrida establecidas.

La razón por la que se utilizó acrilamida a una concentración constante de monómero del 8% fue porque, según el manual de la cámara electroforética Run One Cell (Run One system) esta concentración de monómero tenía un rango lineal de separación óptimo de 40 y 1000 pb. Sin embargo, en el caso de las geles corridas y analizadas no fue así.

La estimación de la masa molecular de las diferentes bandas observadas en los patrones de restricción de los distintos clones de cada aislado de *T. cruzi* se reportó en el cuadro 5 (*vid* apéndices C y D para mayor detalle del cálculo de la masa molecular y factor de corrección).

Figura 29

Variación en la migración del control interno de 143 pb dentro de una misma gel, como ejemplo de la migración no lineal para fragmentos menores de 200 pb.



Migración de los fragmentos digeridos con *RsaI* del producto de PCR clonado del aislado 12. MM es el marcador molecular de 25 pb. M es el marcador de masa molecular de (100 + 25) pb. D = producto de PCR de un clon recombinante digerido con *RsaI*. ND = producto de PCR no digerido.

Cuadro 5

Estimación de la masa molecular de las diferentes bandas observadas en los patrones de restricción de los distintos clones de cada aislado de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) corregidas con el patrón interno de 143 pb.

Aislado 4

	clon 1	clon 2	clon 3	clon 5	clon 6
	458	454	458	291	458
				165	
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Total (pb)	601	597	601	598	601

continuación cuadro 5

Aislado 10

	clon 11	Clon 12	clon 14	clon 15	clon 17
	451	296	451	210	453
		161		243	
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5	1.5
Total	594	600	594	595	596

Aislado 12

	clon 1	Clon 9	clon 10	clon 11	clon 16
	220	204	166	183	158
	236	254	187	270	294
			104		
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	5.5	5.5	2.5	2.5	-1.5
Total (pb)	599	601	600	596	595

Aislado 13

	clon 3	Clon 9	clon 10	clon 11	clon 15
	458	458	454	457	456
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	6	6	2	2	3.5
Total (pb)	601	601	597	600	599

continuación cuadro 5

Aislado 14

	clon 1	clon 3	clon 5	clon 6	clon 7
	453	215	452	179	201
		236		277	253
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total (pb)	596	594	595	599	597

Aislado 18

	clon 11	clon 12	clon 14	clon 15	clon 17
	169	174	373	453	452
	288	280			
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	3	3	3	-1	3
Banda no visible (pb)	80				
Total (pb)	600	597	596	596	595

Aislado 23

	clon 32	clon 33	clon 35	clon 36	clon 40
	195	449	166	373	453
	255		287	83	
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	0.5	0.5	-1.5	-5	-9
Total (pb)	593	592	596	599	596

continuación cuadro 5

Aislado 25

	clon 11	Clon 12	clon 13	clon 14	clon 15
	448	453	450	450	450
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Total (pb)	591	596	593	593	593

Aislado 27

	clon 21	Clon 23	clon 24	clon 26	clon 27
	453	240	236	459	240
		217	217		220
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	4	4	1.5	1.5	1
Total (pb)	596	599	596	602	603

Aislado 30

	clon 21	Clon 22	clon 23	clon 24	clon 25
	456	448	458	373	341
					253
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	-
Factor de corrección (pb)	4	7	0	0	-
Banda no visible (pb)					80
Total (pb)	599	591	601	596	594

continuación cuadro 5

Aislado 36

	clon 31	clon 32	clon 33	clon 34	clon 35
	456	452	238	360	277
			215	97	180
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	0.5	-1	-2	-2	-2
Total (pb)	599	595	595	600	599

Aislado 38

	clon 11	clon 12	clon 14	clon 15	clon 17
	362	242	458	210	455
	95	215		167	
				82	
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	9	1	-1.5	-5	-7.5
Total (pb)	600	599	601	602	598

Aislado 50

	clon 1	clon 2	clon 3	clon 4	clon 5
	452	305	191	232	450
		154	125	185	
			99		
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	5	-2	-2	-2	-2
Bandas no visibles (pb)			39	37	
Total (pb)	595	602	596	596	593

continuación cuadro 5

Aislado 59

	clon 11	Clon 12	clon 15	clon 17	clon 19
	354	359	459	452	450
		102			
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	3	-2.5	-6	-0.5	-0.5
Banda no visible (pb)	85				
Total (pb)	582	604	602	595	593

Aislado 66

	clon 21	Clon 22	clon 23	clon 24	clon 25
	457	374	459	459	460
		227			
Estándar interno (pb)	143	-	143	143	143
Factor de corrección (pb)	1.5	-	1.5	1.5	-0.5
Total (pb)	600	601	602	602	603

Aislado 68

	clon 41	Clon 42	clon 43	clon 44	clon 45
	444	444	281	-	445
			169		
Estándar interno (pb)	143	143	143	-	143
Factor de corrección (pb)	13	13	1.5	0	1
Total (pb)	587	587	593	586	588

continuación cuadro 5

Aislado 72

	clon 1	clon 2	clon 3	clon 4	clon 5
	457	282	449	457	452
		168			
Estándar interno (pb)	143	143	143	143	143
Factor de corrección (pb)	0	0	0	0	0
Total (pb)	600	593	592	600	595

2. Identificación de patrones de restricción característicos o esquizodemos de la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo amplificada y clonada

Para la identificación de esquizodemos de la región hipervariable del kDNA del minicírculo amplificada y clonada se observaron y analizaron los patrones de restricción con la enzima RsaI en las geles de acrilamida corridas (*vid* figura 29 para ejemplo de algunos patrones de restricción observados). Se utilizó como base una razón estimada entre la masa molecular de la banda en estudio y la masa molecular de la banda del control interno de 143 pb para definir mejor los esquizodemos (*vid* apéndice E para mayor información). No obstante, no se pudo identificar algún esquizodemo. Esto sugiere que la región hipervariable del kDNA del minicírculo de los aislados de *T. cruzi* es altamente variable para el sitio de restricción RsaI.

3. Búsqueda de posibles sitios de restricción en la región hipervariable del ADN cinetoplasto (kDNA) del minicírculo secuenciada

La identificación de esquizodemos se complementó con la búsqueda de posibles sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, HinfI, y HaeIII en la región hipervariable del kDNA del minicírculo amplificada, clonada, y secuenciada. Los clones que no presentaron ningún posible sitio de restricción con dichas enzimas, se analizaron con las enzimas Sau3AI, y AluI. Este análisis se hizo con el “software” DNAsis (Hitachi Software Engineering Co. Ltd and Molecular Biology Insights, Inc of Cascade, Colorado).

Los cuadros 6, y 7 muestran los resultados de la búsqueda de posibles sitios de restricción de los clones secuenciados; y la figura 30 muestra los diagramas de dichos sitios de restricción de algunos clones.

Cuadro 6
Análisis de restricción de los clones secuenciados
con las enzimas de restricción RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII

Aislado -clon	Posición de corte de enzima	Tamaño de los fragmentos orientación 5'-3' (pb)	Tamaño de la secuencia (pb)
10-12	HaeIII – 271 pb RsaI – 146 pb	145, 125, 7	277
10-15	HaeIII – 225 pb RsaI – 98 pb	97, 127, 59	283
12-10	HinfI – 148 pb RsaI – 38pb , 139 pb TaqI – 169 pb	37, 101, 9, 21, 110	278
12-11	HaeIII – 278 pb RsaI – 32pb, 38 pb	31, 6, 240, 7	284
12-1	HaeIII – 274 pb RsaI – 86pb TaqI – 77 pb	76, 9, 188, 7	280
13-10	HaeIII – 275 pb TaqI – 234 pb	233, 41, 7	281
13-15	HinfI – 126 pb	125, 260	285
4-5	RsaI- 9 pb	8, 272	280
14-3	HaeIII – 276 pb RsaI – 70 pb	69, 206, 7	282

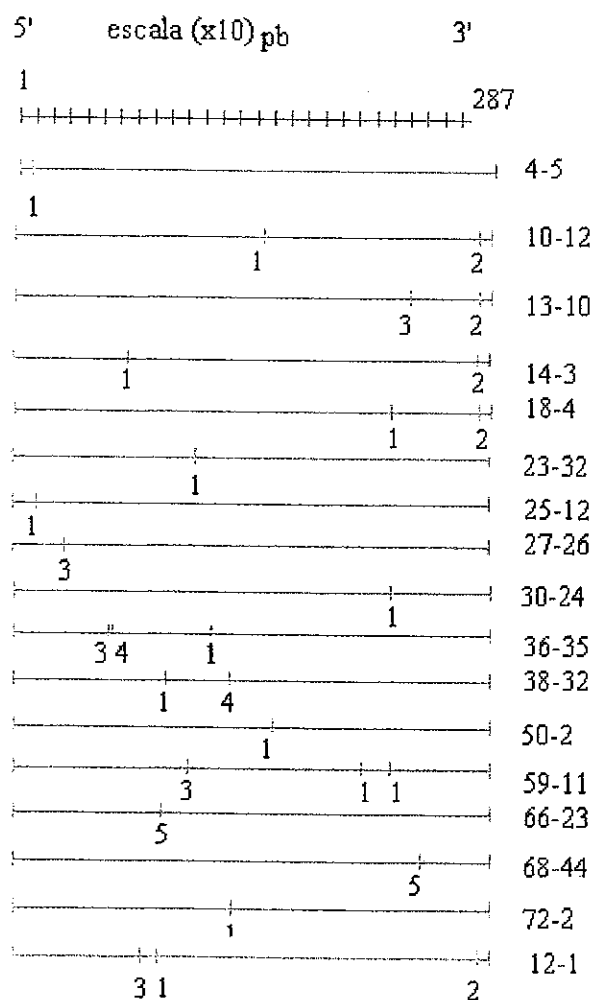
continuación cuadro 6

Aislado -clon	Posición de corte de enzima	Tamaño de los fragmentos orientación 5'-3' (pb)	Tamaño de la secuencia (pb)
14-7	HinfI – 78 pb RsaI – 57 pb TaqI – 235 pb	56, 21, 157, 48	282
18-1	HaeIII – 270 pb RsaI – 15 pb	14, 255, 8	277
18-4	HaeIII – 274 pb RsaI – 223 pb	222, 51, 7	280
23-32	RsaI – 108 pb	107, 169	276
23-36	RsaI – 207 pb	206, 68	274
25-12	RsaI-15 pb	14, 263	277
27-26	TaqI – 31 pb	30, 246	276
27-27	RsaI – 76 pb	75, 211	286
30-24	RsaI – 224 pb	223, 59	282
30-25	RsaI – 103 pb	102, 166	268
36-33	RsaI – 64 pb	63, 211	274
36-35	HinfI – 56 pb RsaI – 116 pb TaqI – 59 pb	55, 3, 57, 161	276
38-31	RsaI – 200 pb, 209 pb TaqI- 226 pb	199, 9, 17, 56	281
38-32	HinfI – 129 pb RsaI – 91 pb	90, 38, 153	281
50-2	RsaI – 157 pb	156, 131	287
50-3	HinfI – 44 pb RsaI – 38 pb, 161 pb, 208pb	37, 6, 117, 47, 79	286
59-11	RsaI – 198 pb, 214 pb TaqI – 101 pb	100, 97, 16, 57	270
66-22	HinfI – 72 pb RsaI – 82 pb	71, 10, 189	270
68-43	RsaI – 15 pb TaqI – 225 pb	14, 210, 47	271
72-2	RsaI – 127 pb	126, 149	275
72-3	HinfI – 237 pb TaqI – 83 pb	82, 154, 42	278

Cuadro 7
Análisis de restricción con Sau3AI y AluI de los clones secuenciados que no presentan sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII

Aislado -clon	Posición de corte de enzima	Tamaño de los fragmentos orientación 5'-3' (pb)	Tamaño de la secuencia (pb)
4-6	Sau3AI - 70 pb	69, 212	281
59-17	No tiene ningún sitio de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII, Sau3AI, AluI (279 pb total)		
66-23	AluI - 88 pb	87, 192	279
68-44	AluI - 234 pb	233, 39	272

Figura 30
Diagramas de los sitios de restricción para las enzimas RsaI, HaeIII, TaqI, HinfI, y AluI en algunos clones secuenciados



Nota: los números en los diagramas respectivos indican lo siguiente: 1 = RsaI, 2 = HaeIII, 3 = TaqI, 4 = HinfI, AluI = 5. 68-44 indica aislado-clon.

Debido a la ausencia de patrones conservados para las diferentes enzimas de restricción buscadas entre diferentes aislados, se presume fuerte desequilibrio de unión o "linkage disequilibrium", sugiriendo falta de recombinación dentro y entre minicírculos. Estos resultados apoyan la teoría mencionada por Macedo, *et. al.* (1998) sobre la estructura clonal de *T. cruzi* (modelo histotrópico). Por otro lado, la búsqueda de los sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, AluI, Sau3AI, HinfI, y HaeIII en las secuencias sugiere también alta variabilidad entre aislados, misma conclusión que se llegó con los resultados de RFLP.

D. Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables secuenciadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

Para poder determinar la variabilidad génica entre las secuencias de las regiones hipervariables amplificadas, y clonadas se compararon de la siguiente manera:

- i) Entre cada aislado de *T. cruzi*.
- ii) Entre aislados de *T. cruzi* del mismo departamento.
- iii) Entre aislados de *T. cruzi* de distintos departamentos.

En este último punto se incluyó el análisis con la secuencia de la cepa Y Brazil de *T. cruzi* (No. de acceso 18814 en GeneBank™). Para tener una mejor perspectiva sobre la variabilidad, se dejó al final del tercer punto tratado, el análisis y discusión de resultados.

Las comparaciones de secuencias se hicieron con base en dos distintos análisis de alineación múltiple:

- i) Alineación múltiple progresiva de secuencia basado en el método de Higgins-Sharpe (utilizado también en el “software” clustalV) dando como resultado final porcentajes de similitud.
- ii) Alineación de secuencias utilizando el algoritmo de Lipman-Pearson, para similitudes.

También se realizó un análisis del contenido de nucleótidos en las secuencias de los clones, y se buscaron cuadros abiertos de lectura, utilizando el método de Fickett. Para todos estos análisis se utilizó el “software” DNAsis (Hitachi).

Los parámetros utilizados para llevar a cabo las alineaciones múltiples progresivas de secuencia fueron los estándares dados por el “software”, que son los siguientes:

- i) Penalización por espacio o “gap penalty” = 5. Este es un puntaje negativo por alinear nucleótidos de una secuencia con nucleótidos nulos o nucleótidos distintos de la otra secuencia.
- ii) K-tuple = 4. Parámetro que especifica el tamaño del óligo dentro del cual se buscan regiones similares.

- iii) Número de diagonales importantes o “No. of Top Diagonals” = 5. Parámetro que especifica el número de alineaciones iniciales principales para optimizar la alineación.
- iv) Tamaño de ventana o “window size” = 5. Este parámetro determina que tan lejos buscar de cada lado de la diagonal principal.
- v) Penalización por espacio fija o “fixed gap penalty” = 10. Este es el costo por abrir o introducir espacios dentro de la alineación.
- vi) Penalización por espacio flotante o “floating gap penalty” = 10. Una vez abierto un espacio, este parámetro determina el costo o penalización por aumentar el tamaño de dicho espacio en un residuo.

Los parámetros utilizados para hacer el análisis de similitud fueron los preestablecidos en dicho “software”. El parámetro de corte mínimo o “cutoff” fue de 45. Este parámetro marca la puntuación de corte mínimo de similitud, buscando entonces la similitud máxima de secuencias arriba de ese valor. El parámetro de corte superior o “ktup” marca el número mínimo de bases que deben concordar exactamente para extraer la región de máxima similitud entre las secuencias. El valor del parámetro fue de 4.

Los parámetros utilizados para encontrar los cuadros abiertos de lectura, utilizando el método de Fickett, fueron: la tabla de codones universal y la tabla de codones mitocondrial de protozoos. En ambas tablas se especificó que el codón de iniciación fuera AUG, mientras que los de terminación fueran UAA, UAG, los cuales eran los preestablecidos por el “software” DNAsis.

1. Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre cada aislado de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

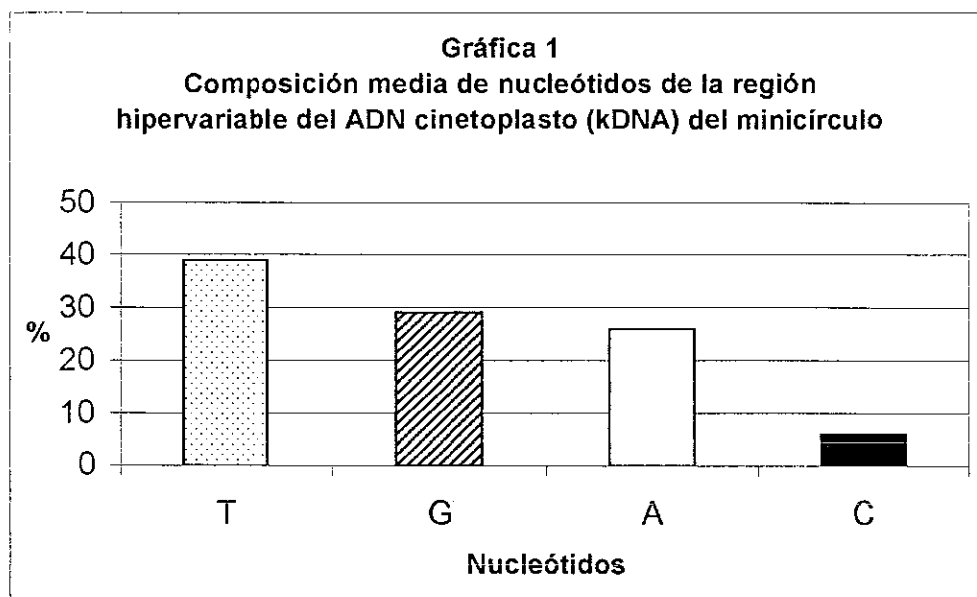
A continuación se muestra un análisis del contenido de nucleótidos, en porcentaje, de cada uno de los clones secuenciados de los distintos aislados de *T. cruzi* (vid cuadro 8 y gráfica 1). También se muestran las alineaciones correspondientes entre clones del mismo aislado, así como su respectivo diagrama de similitud de secuencias por parejas (vid figura 31).

Cuadro 8
 Contenido de nucleótidos, en porcentaje, de cada uno de los clones secuenciados de los distintos aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

Departamento	Especie	# aislado	# Clon	% T	% G	% A	% C
Jutiapa	<i>T. dimidiata</i>	4	5	38.57	27.85	28.21	5.35
			6	39.50	30.96	24.91	4.62
Zacapa	<i>T. dimidiata</i>	10	12	38.98	29.96	25.27	5.77
			15	35.33	30.74	27.91	6
Zacapa	<i>R. prolixus</i>	12	1	41.78	27.85	23.92	6.42
			10	38.48	28.77	27.33	5.39
			11	38.02	30.98	22.53	8.45
Zacapa	<i>R. prolixus</i>	13	10	39.85	28.46	23.84	7.82
			15	41.40	28.42	25.96	4.21
Zacapa	<i>T. dimidiata</i>	14	3	40.07	27.30	26.95	5.67
			7	40.07	25.17	28.01	6.73
Chiquimula	<i>T. dimidiata</i>	18	1	38.62	29.96	26.71	4.69
			4	38.57	27.14	28.21	6.07
Sta. Rosa	<i>T. dimidiata</i>	23	32	40.94	25.36	28.62	5.07
			36	38.68	26.27	27.37	7.66
Sta. Rosa	<i>T. dimidiata</i>	25	12	37.90	26.71	28.88	6.49
Sta. Rosa	<i>T. dimidiata</i>	27	26	40.57	29.34	25.36	4.71
			27	40.55	28.67	24.47	6.29
Sta. Rosa	<i>T. dimidiata</i>	30	24	40.42	29.78	25.53	4.25
			25	39.92	26.49	28.35	5.22
Chiquimula	<i>T. dimidiata</i>	36	33	38.68	29.92	26.27	5.10
			35	40.21	34.78	21.73	3.26
Jutiapa	<i>T. dimidiata</i>	38	31	41.63	23.48	25.62	9.25
			32	37.36	29.18	27.04	6.40
Jutiapa	<i>T. dimidiata</i>	50	2	39.72	31.01	24.04	5.22
			3	41.60	26.57	24.82	6.99
Jalapa	<i>T. dimidiata</i>	59	11	43.33	28.88	23.33	4.44
			17	38.57	31.07	25.71	4.64
Jalapa	<i>R. prolixus</i>	66	22	40.74	27.77	27.03	4.44
			23	38.35	26.52	29.74	5.37
Jalapa	<i>T. dimidiata</i>	68	43	40.95	29.88	23.24	5.90
			44	36.39	27.20	30.14	6.25
Jutiapa	<i>T. dimidiata</i>	72	2	38.18	28.00	27.27	6.54
			3	38.48	30.57	26.25	4.67

(X ± SD)*	39 ± 2	29 ± 2	26 ± 2	6 ± 1
-----------	--------	--------	--------	-------

* Donde, X = Media aritmética
 SD = Desviación estandar



El contenido de T:G:A:C de la región hipervariable, en términos de razón, se traduce a 7:5:4:1 respectivamente.

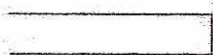
Al hacer una alineación de secuencias de las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del kDNA entre cada aislado de *T. cruzi* por el método de Higgins-Sharpe se observó que hay un fragmento de secuencia casi conservada tanto en el extremo 5' como el extremo 3' (*vid* figura 31)

Figura 31

Alineación de secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los clones de un mismo aislado, así como su diagrama de similitud. Las secuencias se muestran en orientación de 5' a 3'.

Aislado 4

		10	20	30	40	50	
4-5DJUT.DNA	1	AATAATAGTAC	CTGPGGTGGT	GAGCTGTGFG	TAATGGTA-G	ATGGTATTGFI	50
4-6DJUT.DNA	1	AATAATAGCA-	-TGGGATTTG	GGATTATG-G	TTTTGATTTG	GTAATGTGTG	50
		60	70	80	90	100	
4-5DJUT.DNA	51	TACAGTAG-A	TTGATAGTTG	TGTAG--GCT	TAGATTGTAT	TGTTATGAAT	100
4-6DJUT.DNA	51	AATGATAGTA	GTCAT-GTTG	TTAGATCGTT	TATGTTCTAG	TGGTAGGAGT	100
		110	120	130	140	150	
4-5DJUT.DNA	101	GTAT-GTTAA	ACTGAAACAT	GACTTAGAAG	GTCAAAGTGG	TTGATACATT	150
4-6DJUT.DNA	101	GTGTAGTGAA	GATTTGTTAT	TTGTTGTTGT	ATGTAGTTCT	GTTATGTAGT	150
		160	170	180	190	200	
4-5DJUT.DNA	151	TTAATTTGTTT	ATGTTGATGA	TTATTTAGTT	GTATATGTAT	AGTATATATT	200
4-6DJUT.DNA	151	ATAAT-ATAT	-TATTTAGCA	ATGGTAGGAG	GTTGATGT-T	GATAGGTGGT	200
		210	220	230	240	250	
4-5DJUT.DNA	201	--TGATCTGG	TAGTCTTTGG	TAAAATGTGG	TCACGGAGAA	A-TAAGAATT	250
4-6DJUT.DNA	201	GATAAGTTGC	TGTAAGTTGT	AAAAATAGGG	TTGGAAATTA	TCTGGAAACT	250
		260	270	280	290	300	
4-5DJUT.DNA	251	TTGTTTTGGG	AGGGCCGTTT	AAATTTGGGG	GCGAAAAT..	300
4-6DJUT.DNA	251	TGGTTTTGGG	AGGGCCGTTT	AACTTTTGGG	GCCAGAAT..	300

4-5DJUT.DNA  20.3%

4-6DJUT.DNA

continuación figura 31

Aislado 10

		10	20	30	40	50	
10-12DZA.DNA	1	AAATATAGG	-TA-A-GTTT	GATG-TCGT	GATATTTAT	TGTATA-GT-	50
10-15DZA.DNA	1	AAATATA-AC	ATAATGGTT-	AGTGAATGGT	AG-ACITGTA	TGTGTATTAG	50
		60	70	80	90	100	
10-12DZA.DNA	51	TGTATTATG-	GT-CGTA-G	TTATTGGATG	TATAGTAAATG	ACATTGACTG	100
10-15DZA.DNA	51	ATTGATATAG	TTACATACGA	TTAATGG---	TTTGTAAATG	-----TA	100
		110	120	130	140	150	
10-12DZA.DNA	101	A-AGCGGT	GTC-AAGTA	GTTAGCGAGT	GTACAGTATA	TGCTATG-TC	150
10-15DZA.DNA	101	AGTAGATAAT	GTACITGTA	-TT-GTGT	ATAGAG-ATG	TG-TAAGTA	150
		160	170	180	190	200	
10-12DZA.DNA	151	ATGT-TACTA	TGTACTCIAT	AAA-TGTT-C	TTAAGTATT	TTTTGGTTGG	200
10-15DZA.DNA	151	CTGTAT-TAA	TGTATCTAG	GAGGGTATG	TGGATAGGAG	GGGTAGTTGG	200
		210	220	230	240	250	
10-12DZA.DNA	201	ATGGGTTAG-	TGGTGTAGTG	--TGGTTGT	A-G-TAAA	-ATGGGTTTG	250
10-15DZA.DNA	201	ATAGGAGGGG	TACCTGGGTG	AATTACGGAT	AAGCTGTAA	TGTTGGCCTG	250
		260	270	280	290	300	
10-12DZA.DNA	251	AAAAATTGTG	-GAAATCTG	GTTTTGGGAG	GGCGTTCAA	ATTTGGTGGC	300
10-15DZA.DNA	251	AAAAAATTG	GATAACTATG	-TTTTGGGAG	GGCGTTCAA	CTTTTGGGCG	300
		310	320	330	340	350	
10-12DZA.DNA	301	CACAAT....	350
10-15DZA.DNA	301	TCGGAT....	350

10-12DZA.DNA 17.3%

10-15DZA.DNA

continuación figura 31

Aislado 12

		10	20	30	40	50	
12-10RZA.DNA	1	AAATATAGTGT	GCGGGA-TAT	AAATGAATTTG	GGT----GTG	GTACTTGGAA	50
12-11RZA.DNA	1	AAATATAGGTT	GTGGG-GT-G	GGTGGGCTAG	AGTACCT---	GTACTGAATG	50
12-1RZA.DNA	1	AAATATAAGGA	TTTGGTTATT	AGTGTGTTAA	GGTA---GT-	-TATTGGATA	50
		60	70	80	90	100	
12-10RZA.DNA	51	TGATTGTTTT	GATAGAGTGT	AGTTTAG---	ATTATA-TGT	TTGATTTTTGT	100
12-11RZA.DNA	51	TGGTTATGAT	TG-GCTGTTT	TGTTTGGGAT	ACTATAATGA	TTTGGTT-TAT	100
12-1RZA.DNA	51	T-TCTTGAT	TGTGTAGGAT	AGTATGTGA-	GTTTCGATAG	TGTAC----A	100
		110	120	130	140	150	
12-10RZA.DNA	101	ATAT-TGTAG	TGATGTTGTT	TCAGA-TACG	AATAA----A	GATTGGATGG	150
12-11RZA.DNA	101	CTATACATGA	TATGA----A	TCAGAGT-TG	AGTGAATGAA	GT-TTGGTGT	150
12-1RZA.DNA	101	ACAAATAGAA	TGTGTATCTA	TGTGGGTTAA	GTTGTTATAT	G-TTTGTATC	150
		160	170	180	190	200	
12-10RZA.DNA	151	T-GTACGATG	ATG-ATTC--	TTGTGTTAAC	T-ATGTTTC	GATG--TGTA	200
12-11RZA.DNA	151	CAGTGTAGT-	GTATACCTAA	TCATGTTAGT	TTCATAATCT	ATTTGCTGTA	200
12-1RZA.DNA	151	GATTGTTACT	AGATTTTGT	T-TGTTA--	CTTGTGTTT	ATTTGGGTTA	200
		210	220	230	240	250	
12-10RZA.DNA	201	TTATGTATAA	ACTATAAAAT	ATGGTCTAAG	GGGTT--AGT	ATAGGTTTGG	250
12-11RZA.DNA	201	TTATGGTTGT	GAGA-AGGTT	GCGGTACT	-G-TTGGAGA	GTGGTTACGG	250
12-1RZA.DNA	201	GAGTAGACAT	GGT-TACGGT	GCTTTGTTAT	AAATTTGGG-	--GGTTATAG	250
		260	270	280	290	300	
12-10RZA.DNA	251	AAAATTCGGA	AAGTTCCTGT	TTGGGGAGGG	GCGTTCAAAT	TTGGGGGCGG	300
12-11RZA.DNA	251	AA-T-TCGG	AAATGTTGTT	TTTGGGAGGG	GCGTTCAACT	TTTGGGGCCC	300
12-1RZA.DNA	251	A-ATTCGGT	AAA-GTTGGT	TTTGGGAGGG	GCGTTCAACT	TTTGGGGCCG	300
		310	320	330	340	350	
12-10RZA.DNA	301	AAA.....	350
12-11RZA.DNA	301	AGAT.....	350
12-1RZA.DNA	301	GAAT.....	350



continuación figura 31

Aislado 13

		10	20	30	40	50	
13-10RZA.DNA	1	AAATATAG-CA	TTTATGGGTT	GTTATTGTTG	AGTTGTGGTT	TGGTCTGAAC	50
13-15RZA.DNA	1	AAATATAGATA	TTGGTTATCA	GATGATTAAT	TTTTATTTTG	AGTTATCAAG	50
		60	70	80	90	100	
13-10RZA.DNA	51	TATGTTG-GT	AGT--GTGAG	TATACAAAAGA	TGAATGAGAT	AGG-GTGTAT	100
13-15RZA.DNA	51	TATTTGGTGT	GGTATGTGAC	CGAAGTAAGT	TGTAGAAGAG	AGGTAGAGGT	100
		110	120	130	140	150	
13-10RZA.DNA	101	ACGTATTGTA	AGATTATTGT	ATTGATGTTG	TA-TTACTGT	AATCTTATGT	150
13-15RZA.DNA	101	GTAGATTACA	TTGTTACTGT	ATTTGATTCT	TAGTTATGAT	ATCTTTTATAA	150
		160	170	180	190	200	
13-10RZA.DNA	151	GTGAGTTATT	AATGGTTGTT	GTCATAGGGA	GGGTATGTTG	TTGGTA-GTG	200
13-15RZA.DNA	151	ATTTGTTAT-	GGTAGTTATT	GTGTTGGGGA	TGGTAGGTAT	ATGGTATGIG	200
		210	220	230	240	250	
13-10RZA.DNA	201	GTATACTGTA	TCTGGTAGCT	GAAATTCGGT	TATGATTTTT	CGAGAAACTC	250
13-15RZA.DNA	201	GT-TAAGGTG	GTTATAGGTT	ATATTTTGAT	TTGGAAATTT	CTGGAACTTG	250
		260	270	280	290	300	
13-10RZA.DNA	251	TGGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AACTTTCAGG	GCCAGAAT..	300
13-15RZA.DNA	251	TG-TTTTGGG	AGGGGCGTTC	AAATTTGGGG	CGGAAAAT..	300

13-10RZA.DNA 24.5%

13-15RZA.DNA

continuación figura 31

Aislado 14

		10	20	30	40	50	
14-3DZA.DNA	1	AAATATAGGGG	TTGTGCAGG-	-TGATGTTAA	TTTTGGATAG	TTA---TTGA	50
14-7DZA.DNA	1	AAATATAGAGG	ATGGGTAGGA	TTTTGGATTAG	TATTAGATTA	TTAATTTTGA	50
		60	70	80	90	100	
14-3DZA.DNA	51	TTGGGTATAT	TGATTTGATT	GCG-TACATG	ATTGAATACG	ATAGATGGGG	100
14-7DZA.DNA	51	TTGAGTACAT	GTTATAGAGT	GTCGCAGACT	CTGTATACT	ATTGTTTGTG	100
		110	120	130	140	150	
14-3DZA.DNA	101	-GTAATGTA-	TAGTTAGTTT	GATATCTTT	TATTTGT-TG	TTGAGTAAGA	150
14-7DZA.DNA	101	TGCAGTTGAA	TAGTGAATAC	ATTAATTAG	TGTATATCTG	TTATATGATA	150
		160	170	180	190	200	
14-3DZA.DNA	151	ATATGTTATA	ATGTGTTGGC	TAGATAAAAC	GGTTACTCTA	GGTTTGAATT	200
14-7DZA.DNA	151	GT-TACGATA	TTTATTTGAT	TATATAGGTT	TGGGTTAGTC	ACTAGTAAAA	200
		210	220	230	240	250	
14-3DZA.DNA	201	GTTTTGTGTT	TGGTAGATAA	GGTAATTTGT	AGAGGTAAAA	AAATCAGAAA	250
14-7DZA.DNA	201	GTTTGGT-TT	CGGCT--TAA	AATAGGGTAT	GGAATTT---	--TCGAGGAA	250
		260	270	280	290	300	
14-3DZA.DNA	251	TTTTGATTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTC	AGGGCCCAAT	T.....	300
14-7DZA.DNA	251	ATTTGATTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGACCCGATT	T.....	300

14-3DZA.DNA 21.9%

14-7DZA.DNA

continuación figura 31

Aislado 18

		10	20	30	40	50	
18-1DCHI.DNA	1	AATATAGCGG	TTG--TACTT	-GGATTGGAA	TAAATGGTTG	TGATTTAGTA	50
18-4DCHI.DNA	1	AATATAG-GT	TCGGGTGCTT	AGGGTTAGGG	GTAGTAACAG	-AAITTAITA	50
		60	70	80	90	100	
18-1DCHI.DNA	51	TTGTGTTATG	AAGTGTG-AG	GTATGTATGA	TT-AGATA-G	TGTGCTGIGA	100
18-4DCHI.DNA	51	TTGTGA-GTA	GATCGTATAG	TTATGATTAG	TTTATATAAG	TGTGTATTCT	100
		110	120	130	140	150	
18-1DCHI.DNA	101	AAGAATAGT-	GAAGAGAGTG	ACTAGAGTT-	TCTTTGTTTA	T-GTTAGTAG	150
18-4DCHI.DNA	101	TTGTATGGTT	GAAGTGAATA	TGTTTAGTGG	TATGTTCTTA	TTGATTGTTG	150
		160	170	180	190	200	
18-1DCHI.DNA	151	ATCAATTGTTA	TACTTTTACT	TATAATATAA	TATGAGGGGT	TAAAGGTTTA	200
18-4DCHI.DNA	151	AGTGAAGATG	GAAATTTTGT	TATGG-ATAA	GA-ATGATAT	TGTGTGTTGA	200
		210	220	230	240	250	
18-1DCHI.DNA	201	AGGTGGGIGT	TGTGGATACT	TATGGGTAT	AAATTTTTCG	GGAAAGTCTG	250
18-4DCHI.DNA	201	TTCTTAAAAC	TGTGTAAAATA	AGTGGGT-AC	GGAAATTCG	GAAATCCGG	250
		260	270	280	290	300	
18-1DCHI.DNA	251	GTTTTGGGAG	GGCGGTTCAA	ATTTGGGCC	GGAATT....	300
18-4DCHI.DNA	251	TTTTTGGGAG	GGCGGTTCAA	ATTCAGGGC	CTAAAT....	300

18-1DCHI.DNA 20.2%

18-4DCHI.DNA

continuación figura 31

Aislado 23

		10	20	30	40	50	
23-32DRO.DNA	1	AATATAGGCT	AAGTCTTATT	TCTGAATTTC	TGGTATTGTC	TATTTATGAA	50
23-36DRO.DNA	1	AATATACAGT	GTGGTATAGA	TGAGTGTGAG	TGTTATTTTC	ATTTGATTTGA	50
		60	70	80	90	100	
23-32DRO.DNA	51	TGTTACTAAC	GAAATGAGTT	GATTAGTAGA	GTTTGTTTGG	TAGGATTTGT	100
23-36DRO.DNA	51	TAG-AGTGTA	GTAATGTTGT	GATATACTGT	GGTGATAAGA	ATAGACATGG	100
		110	120	130	140	150	
23-32DRO.DNA	101	TTTATGTACG	TTGAT-TAGA	TTTGAATGTA	TTA-AGTATA	TAIGTTTGT	150
23-36DRO.DNA	101	ATTA-GTAAG	TGAGTATAGA	TT--ATTCTG	TTATAGTTTG	TTTGTTTGCT	150
		160	170	180	190	200	
23-32DRO.DNA	151	AGAGGGTATG	ATATAGGTAT	GGTATAGGTG	GTATATTTCT	GAATTGTTGA	200
23-36DRO.DNA	151	ACTGT-TATA	CTGTTCAATC	AATTTAGA-G	GTATGATAAG	GTAGTATAGG	200
		210	220	230	240	250	
23-32DRO.DNA	201	TA-AITTTGTT	ATA-ATAGGT	AGGTCAGAAA	TTCGGTAAAC	TTTGTATTTG	250
23-36DRO.DNA	201	TTTATTTTTC	GTACGCTTAT	GATCCTGAAA	ATGCAGAAAA	CTCGGTTTTC	250
		260	270	280	290	300	
23-32DRO.DNA	251	GGAGGGGCGT	TCAAATTTGG	ACCTGCAAAA	300
23-36DRO.DNA	251	GGAGGGGCGT	TCAAATTTGG	GGCCGCAATT	300

23-32DRO.DNA 24.8%

23-36DRO.DNA

continuación figura 31

Aislado 27

		10	20	30	40	50	
27-26DRO.DNA	1	AATATAGGAA	TTGTTATGGT	G'GT'ITA--T	TTCGATAAAT	TAGATTTGTA	50
27-27DRO.DNA	1	AAC-TATAAG	CTGG-ATGGT	ATTGTTACTT	TTTGTTAGTT	AGAATTGGTC	50
		60	70	80	90	100	
27-26DRO.DNA	51	TATTGTGATT	TGTTAGAGAT	G--AGGTT--	AGTGGTGAAT	AGTAGATAGA	100
27-27DRO.DNA	51	TAGTGTAGAT	TATGACATGT	GTTATGTACA	AGCTTTGAAT	TCGTGATAGG	100
		110	120	130	140	150	
27-26DRO.DNA	101	TTGTTAGTGA	GTTATGATAC	ATTGATTTGA	TAGATAAC-T	ACGT-TAAT	150
27-27DRO.DNA	101	ATAGTATAGA	GTTGAATTAC	TATGTTTTAG	TTTGTATATG	TTGAATGTAT	150
		160	170	180	190	200	
27-26DRO.DNA	151	GT-TATAATG	-GTATAGGTG	GGTGAATAGGA	TACATGGTAG	GTTTGT---A	200
27-27DRO.DNA	151	GTATATAGTT	TGTATGGTAA	GATTAAT-CCG	TGGGTTGTGG	ATTGGTTAAG	200
		210	220	230	240	250	
27-26DRO.DNA	201	GTAGGTTGCT	TCCGTTTGT	-ATAGGTTGA	GGTTATAAAT	TTGTGGAAAG	250
27-27DRO.DNA	201	GTCAGATTGT	TGGGCTGACA	GATAITTTGA	GGTTTAAAT	TCGTG-ATTT	250
		260	270	280	290	300	
27-26DRO.DNA	251	TTAGGTTTTC	GGAGGGGCGT	TCAACTTTTC	GGTCCGGATT	300
27-27DRO.DNA	251	CTTGGTTTTC	GGAGGGGCGT	TCAGAITTTG	GGCCGCAAAA	300

27-26DRO.DNA 18.8%

27-27DRO.DNA

continuación figura 31

Aislado 30

		10	20	30	40	50	
30-24DRO.DNA	1	AACTATAGCA	TACT--AGGC	TTGTGTATTA	ATAAATTTGA	ATTGTGACTA	50
30-25DRO.DNA	1	AA-TATAGGA	AGTTTAAAGC	TTATGGTTTA	ATAG-TTTAT	ATCAGATCTT	50
		60	70	80	90	100	
30-24DRO.DNA	51	GAATGTGGTG	AGGATAGGAT	ACAGCAGAGG	AGTATGTTTT	AAAATGTGTG	100
30-25DRO.DNA	51	GAAATGCTTG	ATGATTGTG-	--AGTGAAGT	--TATAACGT	CAAGTGGAGA	100
		110	120	130	140	150	
30-24DRO.DNA	101	GTAGATTGTG	TGAGTTGATG	TATGAAGAGT	ATATATGTTA	TAGTTTATGT	150
30-25DRO.DNA	101	GTAGATTGTA	CAGTTTGGTT	TG-AITTTATT	TGATTTATTC	TGATTTAT-T	150
		160	170	180	190	200	
30-24DRO.DNA	151	TTATTAAGTG	TGTGGTTGTT	GAT-TACTGT	GATGCTGCGT	GTCGTAGTAT	200
30-25DRO.DNA	151	ATATTA--TG	TATTATTATG	AATATGTTAG	GGTGTATTGG	TTGGTTGTG-	200
		210	220	230	240	250	
30-24DRO.DNA	201	TTGTTTTGTT	ATTGGTGGAT	TTTGCTACTA	AAAAITTCGT	GGAATTTTGG	250
30-25DRO.DNA	201	--GGTTTGT	AC--ATAAAA	TGGTGGGTTA	GAAAAA-CTG	GAAATTTTGG	250
		260	270	280	290	300	
30-24DRO.DNA	251	TTTTGGGAGG	CGTGTTCAGA	TTTTGGGCGG	AAAAAT.....	300
30-25DRO.DNA	251	TTTTGGGAGG	CGCGTTCAAA	TTTTGGGCCC	GAAAT.....	300

30-24DRO.DNA 25.3%

30-25DRO.DNA

continuación figura 31

Aislado 36

		10	20	30	40	50	
36-33DCH.DNA	1	AATATAG-CA	CTGTTGTTGG	TTTATGG-AT	TTGATAAAGG	CGTGG-TGGT	50
36-35DCH.DNA	1	AATATAGGTA	TTGGTGGGTG	TAGGTGGGAT	AAGTTGATGT	TGTAGATGGT	50
		60	70	80	90	100	
36-33DCH.DNA	51	TATTA---TG	ATGTAGTGTG	CTATTGAGGT	TGTGCTGATA	GAGAGTGGAT	100
36-35DCH.DNA	51	TGGTGAATCG	ATGTGTTAAG	TTGTTTTA-T	TGTGGT-ATA	GAGTGTITGA	100
		110	120	130	140	150	
36-33DCH.DNA	101	TAGT-TGTAG	AAT-TGTG-A	TGTTAATTTA	TTCAT-GATA	CATTAATAGA	150
36-35DCH.DNA	101	TATPATGTTG	AATGTGTACG	TATTAAGTTT	TTCGTTGGTG	GATGGAGTGA	150
		160	170	180	190	200	
36-33DCH.DNA	151	TTGTTTC--T	TA-ACATTATG	TATGAGGGTA	GGTGTGGTAG	ACTAGGTGTA	200
36-35DCH.DNA	151	TAGTATAAGT	TATGTTTGTG	T-TGAATGTT	GGTGTGTAA	G--AGTTGGA	200
		210	220	230	240	250	
36-33DCH.DNA	201	TGGTGTGGTA	TTGATTAATA	CTTGAGGTGA	TAAAATTTAT	GGGGAAAGTT	250
36-35DCH.DNA	201	TCATAGAAATG	TTGGTTAAG-	--TGGGTTTG	GAAAAT-GT	GGAGG--GTT	250
		260	270	280	290	300	
36-33DCH.DNA	251	GATTTTGGGA	GGGGCGTTCA	AATTTATGGC	GGAAAAT...	300
36-35DCH.DNA	251	GGTTTGGGA	GGGGCGTTCA	ACTTTTGGGG	CGGAAAT...	300

36-33DCH.DNA 21.5%

36-35DCH.DNA

continuación figura 31

Aislado 38

		10	20	30	40	50	
38-31DJU.DNA	1	AATATAACCA	GTGTGTGGC-	-TTAGGGTTG	GGCTT-GCTT	ATAGATGTTA	50
38-32DJU.DNA	1	AATACAGCAT	GTAGATGGTA	TTTAAAGTTG	AGTATAGGTT	TCATATGTTA	50
		60	70	80	90	100	
38-31DJU.DNA	51	TTG-TATGT-	TTGTTCGGTC	TGG-ATGTGT	TATTCTTAGT	TATGTAGTTA	100
38-32DJU.DNA	51	GAGGTTGTGA	TTGTATTGTG	TGATGTATGT	TGATCATAGT	-ACAGGATAG	100
		110	120	130	140	150	
38-31DJU.DNA	101	TGTAGTTCAT	TATTCATTCA	CCACATAGTA	TTATATAAAT	TATATTCATA	150
38-32DJU.DNA	101	TAACGATGAG	GAGACTTAAG	TTATAGTTGA	TTCTGTGTGT	AATGTTAGTA	150
		160	170	180	190	200	
38-31DJU.DNA	151	ATTTTCTTAT	AATGTTATGT	TATATAGITT	GTTGTTTATT	ATATATGATA	200
38-32DJU.DNA	151	GTTGT-TTAT	GTT--TGTAT	AAGTTGATGT	AG-GTAGGGT	AGTTGTTAGA	200
		210	220	230	240	250	
38-31DJU.DNA	201	TCGGTACGTC	TTGTACGGGT	AAGAGTGGGT	TCGAAAAAAT	GCGGAAATTT	250
38-32DJU.DNA	201	TGGTACCGG	TTATTCTAA-	AATTTGGGGT	TCAGAAATTC	GIGAAAGTCT	250
		260	270	280	290	300	
38-31DJU.DNA	251	GGTTTGGGA	CGGGCGTTCA	AATTTGGGGC	CGAAAAA...	300
38-32DJU.DNA	251	GGTTTGGGA	GGGGCGTTCA	AATTTGGGAC	CGCAAAA...	300

38-31DJU.DNA 23.8%

38-32DJU.DNA

continuación figura 31

Aislado 50

		10	20	30	40	50	
50-2DJUT.DNA	1	AATATA---T	ACGTTATGCA	TGCAACGGTA	GAATTGAGTT	AATCGTTGTT	50
50-3DJUT.DNA	1	AATATAGAGT	GAGTTATGGA	TGGGA-GGTA	-AGTTATGTA	CTTTGATTCT	50
		60	70	80	90	100	
50-2DJUT.DNA	51	TGGGTATGT-	GTAGATAAAG	TTGTAGATTG	TATGTGTGAG	-GTGTAATGT	100
50-3DJUT.DNA	51	TATGTTTATT	GMTTGTTTAG	TTGTGTTTGG	TATCATGTG	TATATAGTTT	100
		110	120	130	140	150	
50-2DJUT.DNA	101	---TTATGTG	AGG-TGTTGT	ATATCGTTAG	TTAGAGTGT	ACTGAGTGT	150
50-3DJUT.DNA	101	GGGTTGTGTG	AGGACGTGAG	AAGTGGTTA-	TTATAGTGTG	ATAGATTATA	150
		160	170	180	190	200	
50-2DJUT.DNA	151	TTTGTGTTTG	ATAGTACAGT	AAGTTTGTAG	GTATAGTTTG	TTATTGCTG	200
50-3DJUT.DNA	151	---GTAATTA	AT---TTGT	AC-TTATAG	TTCTTATCCA	TTAATCA-TA	200
		210	220	230	240	250	
50-2DJUT.DNA	201	TTGTGGT-TA	TAGTTATGTG	GTATGGTGCA	AGTTAGGS--	GTCAGAAAT	250
50-3DJUT.DNA	201	TTATAACATA	AATTCATTGA	CTG-GTTGGT	GGTAAAGGTG	GTTGAAGATT	250
		260	270	280	290	300	
50-2DJUT.DNA	251	TACGAAAT	CTGGTTTGG	GAGGGCGTT	CAGATTTGG	CCGAAAT.	300
50-3DJUT.DNA	251	TCTGAAATA	CCGGTTTGG	GAGGGCGTT	CAACTTTGG	GGCCAGAAAT.	300

50-2DJUT.DNA 22.0%

50-3DJUT.DNA

continuación figura 31

Asilado 59

		10	20	30	40	50	
59-11DJA.DNA	1	AATAAAGGT	-AGAT-TGGT	AGTTAATGCT	TTATTTATTA	TTGTGTAT-A	50
59-17DJA.DNA	1	AATATAGACT	TGGGTGTGGT	GATAGAGTAT	AGGTGTAGGA	ATTTATATGA	50
		60	70	80	90	100	
59-11DJA.DNA	51	TATTTGTGAT	ATTAGTAAGA	GACGGATGAG	AGAAGTGTTT	GTGGAGTTGT	100
59-17DJA.DNA	51	TAGTTTTAGT	GAGTGTATTA	TAGTGATGGT	ATAGAGGAT-	GTGATGTAGT	100
		110	120	130	140	150	
59-11DJA.DNA	101	TATCGATT-G	TTTGTTTGTT	GATTATTATG	TT---ATTGT	ATATGTTATA	150
59-17DJA.DNA	101	-ATGAGTTAG	AATGCGAGAT	AGAAATTTTG	TTTAGATTGT	TTATGTTAC-	150
		160	170	180	190	200	
59-11DJA.DNA	151	CTATTATTTA	TGTTGTGGGG	TTGTA-CGTG	-GTGTATGCT	TGCTGTGGTT	200
59-17DJA.DNA	151	CTAATGTTTG	TTATCTAAGG	TTGAATGGTA	TGTATGTTGA	TAGTGTGCTG	200
		210	220	230	240	250	
59-11DJA.DNA	201	ATT---GGTA	CATGCTAAAA	TTG-GTACGG	AAATCTGGG	AAAGTTAGTT	250
59-17DJA.DNA	201	GTTTGGAGTA	TGTGGTAAGG	TTAAGGGTTA	AAAATTTCCG	AAGCCTGGTT	250
		260	270	280	290	300	
59-11DJA.DNA	251	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TTGGGGTCAG	ATT.....	300
59-17DJA.DNA	251	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TTGGGGTCGA	TTT.....	300

59-11DJA.DNA 25.5%

59-17DJA.DNA

continuación figura 31

Aislado 66

		10	20	30	40	50	
66-22RJA. DNA	1	AATATAAGGA	ATTGTTTATG	ATGATTTAG-	AGTATTGATT	T-GTTTGAAT	50
66-23RJA. DNA	1	AATATAGAGC	GTTGATTATG	ATGGTGGAGAT	AATGTTGATA	TAGTTTGAAT	50
		60	70	80	90	100	
66-22RJA. DNA	51	ATGT-TTATA	GTAG-----A	GTGTGGCAGA	CCTTA-TGT	ACTAGTTTG-	100
66-23RJA. DNA	51	ATTTGTTATT	ATAGTTTTAA	TTGTATTGAA	GTTGTAGCCT	AGACATATAA	100
		110	120	130	140	150	
66-22RJA. DNA	101	TATGCAGTGT	GTTGTAGTA-	TAGTTGTAAT	TGTGGCGTGT	ATATACTTTG	150
66-23RJA. DNA	101	CAGACAACAA	ATGGTAGTAG	TGAAGATAGA	TTTTGTGAGT	-TGTATAAAG	150
		160	170	180	190	200	
66-22RJA. DNA	151	ATC-TATGTT	ATATATTATT	TGTTAATTAT	GATTGTATAG	GTAGTGGATG	200
66-23RJA. DNA	151	ATAGTATGTT	ATAGTTTATT	CAATA-TTAA	GATACTAGTG	GAGATAAGTG	200
		210	220	230	240	250	
66-22RJA. DNA	201	GTTGTAAGTG	AGGTGGAAT	GGTGTGAAA	ATTTTGAGAA	ACTTGTGTTT	250
66-23RJA. DNA	201	-TTGCATGTT	AGGTTAATGT	TGAGGTTGAA	AATGCTTTGG	GTTTGGTTTT	250
		260	270	280	290	300	
66-22RJA. DNA	251	AGGGAGGGGC	GTTCAAATTT	GGGGCGGAAA	AT.....	300
66-23RJA. DNA	251	TGGGAGGGGC	GTTCAACTTT	CGGGGCCCAA	AT.....	300

66-22RJA. DNA 25.1%

66-23RJA. DNA

continuación figura 31

Aislado 68

		10	20	30	40	50	
68-43DJA.DNA	1	AATATAGGAT	TAGTACGGTG	A----GTGAA	GGTTATATGT	TGTATGTTGA	50
68-44DJA.DNA	1	AATATAAGGG	CAGTGGTATA	ATATTATTAA	GATGGTAT-T	AGTATGTTAT	50
		60	70	80	90	100	
68-43DJA.DNA	51	TGACAGTTG-	-TATATTCA-	AGACATAAAG	ATGGTAGGTG	TTTGTGTGTAG	100
68-44DJA.DNA	51	AGTTTGTTC	CTGTATTAGT	GAATGTAGTT	TCAACAAGAG	GAGGT--TAG	100
		110	120	130	140	150	
68-43DJA.DNA	101	TGAATGTTAT	AGTTTGTG-G	TGTTAAGTTT	GTAAGTTGGT	GTTAAACTGT	150
68-44DJA.DNA	101	TGAAGAGT-T	AGTTAGTAAG	TGAATGATGT	GTTA-TTAAAT	GTTGATAAGT	150
		160	170	180	190	200	
68-43DJA.DNA	151	ATTATATTGT	TTATTGGTTG	GNGT-TAGTT	GGGTGGTGC	TATGTTTGTG	200
68-44DJA.DNA	151	AT-ATTAAGT	TTATAAATGT	TCCTATAACT	GTCGGGATGG	GTTGTATAGG	200
		210	220	230	240	250	
68-43DJA.DNA	201	TGGTATGCT	GTAATTTGTG	GTATTAAAA	TTTCGAGAAA	CCTGGTTTTG	250
68-44DJA.DNA	201	TTTTGATGGT	-TAAAATGAG	GTGC-GGAAA	TTTCCAGAAA	GCTGATTTTG	250
		260	270	280	290	300	
68-43DJA.DNA	251	GGAGGGGCGT	TCAACTTTTG	GGGCCG-GAA	T.....	300
68-44DJA.DNA	251	GGAGGGGCGT	TCAAATTT-G	GGGCCGCAAA	T.....	300

68-43DJA.DNA

68-44DJA.DNA

23.2%

continuación figura 31

Aislado 72

		10	20	30	40	50	
72-2DJUT.DNA	1	AAATATAGGCT	TGGGTATATAG	GPTGGATATA	ATGGTGTATAT	AAATGATAGTTT	50
72-3DJUT.DNA	1	AAATATAGTGT	GGGGCTATATAG	GTGTTGTGTGA	ATGGTGTATGT	GA-GT-TTT	50
		60	70	80	90	100	
72-2DJUT.DNA	51	AGTTATGTCT	TTAGTTTTCAG	TATGGTATGTA	TTGATGTGTA	-GTATGTAAC	100
72-3DJUT.DNA	51	GATTGTATGT	GTA-TTATG	TGTTTATAT	TTGATATCGA	TGTGTCCATG	100
		110	120	130	140	150	
72-2DJUT.DNA	101	ATTAAGTTGT	-ATAGAGTGG	TGAGCAGTAC	ATGATTATAT	ACTTAGAGTT	150
72-3DJUT.DNA	101	ACAAAGGAAT	GAGAAAGAGT	TGAGTAAGGT	TTTGTATGTT	TGAGAGTGT	150
		160	170	180	190	200	
72-2DJUT.DNA	151	--ATTGTT-A	AGAG-TATAG	TT-TAGAAC	ATTAATG-AT	TACGTTACTG	200
72-3DJUT.DNA	151	GAATTATTA	ATAACTATAA	TTGTTTGAAT	ATGTATACAG	TGGTTTGGTT	200
		210	220	230	240	250	
72-2DJUT.DNA	201	GTTGCGTTAT	TATGGTGGAA	ATGG-GTATC	GGAAATTTGT	GGAGTCTGG	250
72-3DJUT.DNA	201	ATTGGGT-GT	TGCGGTTAAA	ATGGTGTAT	GGAAATTTGT	GGAA-TCTAG	250
		260	270	280	290	300	
72-2DJUT.DNA	251	TTTTGGGAGG	GGCGTTC AAC	TTTTGGGCGG	CAAAAT.....	300
72-3DJUT.DNA	251	TTTTGGGAGG	GGCGTTC AAC	TTTTGGGGGC	CAAAAT.....	300

72-2DJUT.DNA 27.6%

72-3DJUT.DNA

2. Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) del mismo departamento.

A continuación se agruparon por departamento las secuencias de las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del kDNA, de los clones analizados por secuenciación. En el cuadro 9 se da una idea general sobre que aislados son de cada departamento, mientras que en la figura 32 se muestra las alineaciones de las secuencias de las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del kDNA de los clones y el diagrama de similitud, organizadas por departamento.

Cuadro 9
Aislados agrupados por departamentos

Zacapa	Jutiapa	Chiquimula	Santa Rosa	Jalapa
10	4	18	23	59
12	38	36	25	66
13	50		27	68
14	72		30	

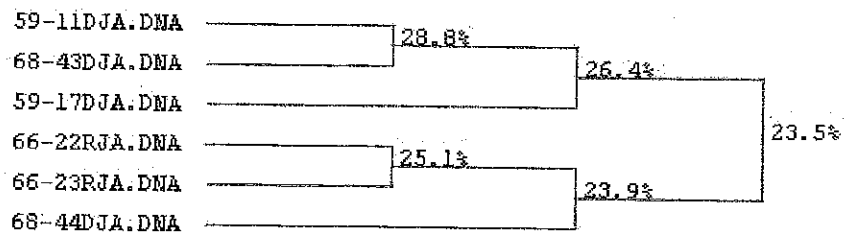
Figura 32

Alineación de secuencias de las regiones hipervariables del minicirculo del ADN cinetoplasto (kDNA) de los clones, organizadas por departamento, así como su diagrama de similitud. Las secuencias se muestran en orientación 5'-3'.

Jalapa

		10	20	30	40	50	
59-11DJA. DNA	1	AAATATAAGG-	-TAGA-T-TG	GTAGT-TAAT	GCTTTATTTA	TTAAT--GT	50
59-17DJA. DNA	1	AAATATAGAC-	-TTGGGTGTG	GTGAT--AG	AGTATAGGTG	TAGGA--AT	50
66-22RJA. DNA	1	AAATATAAGGA	ATTGTTTATG	ATGATTTAG-	AGTATTGATT	T-GTTTTAAT	50
66-23RJA. DNA	1	AAATATAGAC	GTTGATTATG	ATGGTGAGAT	AATGTTGATA	TAGTTTGATT	50
68-43DJA. DNA	1	AAATATAAGG-	-TTAG-TACG	GTGAG-TGAA	GGTT-ATATG	TTGT--AT	50
68-44DJA. DNA	1	AAATATAAGG-	-----GCA	GTGGTATAAT	ATTATTAAGA	TGGTATTAGT	50
		60	70	80	90	100	
59-11DJA. DNA	51	GTATATATTT	GTGATA-TTA	GTATGAGACG	GATGAGAGA-	--AGTGTTTG	100
59-17DJA. DNA	51	TTATATGATA	GTTTTAGTGA	GTGTATTATA	GTGATGGTAT	AGAGGATGTG	100
66-22RJA. DNA	51	ATGT-TTATA	GTAG-----A	GTGTGGCAGA	CTCTTA-TGT	ACT-AGTTTG	100
66-23RJA. DNA	51	ATTTGTTATT	ATAGTTTTAA	TTGTATTGAA	GTGTAGCTT	AGA-CATATA	100
68-43DJA. DNA	51	GTGTATGACA	GTGTGA-TAT	TCAAGACATA	AAGATGGTA-	--GGTGTTTG	100
68-44DJA. DNA	51	ATGTTATAGT	TTGTTTCCCTG	TATTAGTGAA	--TGTAGTTT	CAA-CAAGAG	100
		110	120	130	140	150	
59-11DJA. DNA	101	TGG-AGTTGT	TATCGATTGT	TTGTT-TGTT	GATTAT-TAT	GTTATTGAT	150
59-17DJA. DNA	101	ATGTAGTATG	AGTTAG-AAT	GCGACATAGA	AATTTTGTTT	AG-AITGTTT	150
66-22RJA. DNA	101	-TATGCAGTG	TGTTGT-AGT	-A-TAGTTGT	AATTGT--G	GCGGTATAT	150
66-23RJA. DNA	101	ACAGAGAACA	AATGGT-AGT	-AGTCAAGAT	AGATTT--T	GTGAGT-TGT	150
68-43DJA. DNA	101	TTGTAGTGAA	TGTT-ATAGT	TTGTCTGTIT	AAGTTTGTA	GTGGTGT-T	150
68-44DJA. DNA	101	GAGGTAGTG	AAGAGTTAGT	TAGTAA--GT	GAATGA--T	GTGT-TATTA	150
		160	170	180	190	200	
59-11DJA. DNA	151	ATGTTATACT	ATTATTTATG	TTGTGGGGTT	GTAGGTG-GT	GTATGGTTC	200
59-17DJA. DNA	151	ATGTTACCTA	ATGTTTGHTA	TCTAAGGTTG	AATGGTATGT	ATGTTGATAG	200
66-22RJA. DNA	151	ACPTTGATC-	-TATGHTATA	TATTATTGT	-TAATATGA	TTGTATAGGT	200
66-23RJA. DNA	151	ATAAAGATA-	GTATGTTATA	GTTTATTCAT	-TA-TTAAGA	TACTAGTGG	200
68-43DJA. DNA	151	AAACTGTATT	ATATTGHTTA	TTGGTTGGTG	TTAGTTG-G-	GT-TGGT-GC	200
68-44DJA. DNA	151	ATGTTGATAA	GTATATTA-A	GTTTATTAAT	GTTCCTATAA	CTGTGTGGAT	200
		210	220	230	240	250	
59-11DJA. DNA	201	TGTGGTTAT-	TGGTAC--AT	GGTAAAAT-T	GGTAC-GGAA	ATTCTGGGAA	250
59-17DJA. DNA	201	TGTGCTGGTT	TGGAGTATGT	GGTAAGGHTA	AGGGTTAAAA	ATTTCG-GAA	250
66-22RJA. DNA	201	AGTGGATGGT	TG-TAAGTGA	GGTGGAAATG	GTGTGAAAA	TTTTGAGAAA	250
66-23RJA. DNA	201	GATAAGTG-T	TG-CATGTTA	GGTTAATGTT	GAGGTGAAA	ATGCTTTGGG	250
68-43DJA. DNA	201	TATGTTTGTG	TGGTAT-TGC	TGTAAITTTGT	GGTAAATAAA	ATTTCGAGAA	250
68-44DJA. DNA	201	GGTTTGTATA	GG-TTTTTGAT	GGTTAAAATG	AGGTGCGGAA	ATTTCAGAA	250
		260	270	280	290	300	
59-11DJA. DNA	251	AGTTAGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTT	GGGTCAGAT	T.....	300
59-17DJA. DNA	251	GCTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTT	GGGTCGGATT	T.....	300
66-22RJA. DNA	251	CTTGTGTTTA	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCGGAAAA	T.....	300
66-23RJA. DNA	251	TTTGGTTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTC	GGGGCCAAA	T.....	300
68-43DJA. DNA	251	ACCTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTT	GGGCGCGAAA	T.....	300
68-44DJA. DNA	251	AGCTGATTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCGGAAA	T.....	300

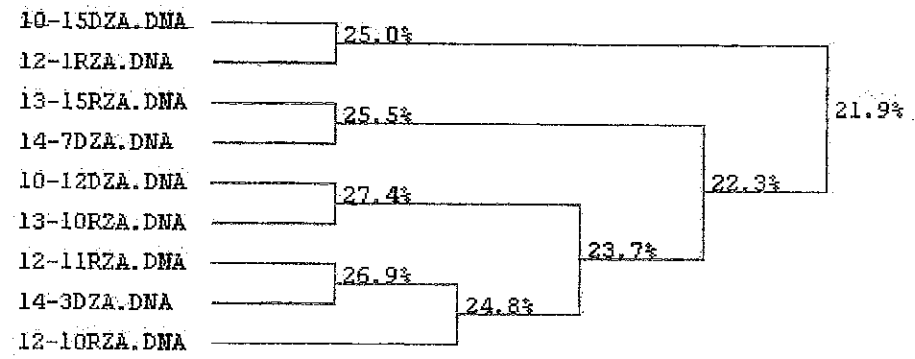
continuación figura 32



continuación figura 32
Zacapa

	10	20	30	40	50	
10-12DZA.DNA	1 AATATAGG--	-TA-A-GTTT	GATC--TCGT	GATATTTTAT	GTATA-GT-T	50
10-15DZA.DNA	1 AATATAACAT	AA-TG-GTT-	AGTGA-ATGG	TAGACTTT---	GTATGTGTAT	50
12-10RZA.DNA	1 AATATAGTGT	GCCGG-ATAT	AAATGAATTTG	GGTGTG----	GTACTTGGAA	50
12-11RZA.DNA	1 AATATAGGTT	GTGGG-GT-G	GGTGGGCTAG	AGTACCT---	GTACTGAATG	50
12-1RZA.DNA	1 AATATAAGGA	TT-TG-GTT-	ATTAGTGTGT	TAAGGTA---	GTTATTGGAT	50
13-10RZA.DNA	1 AATATAGCAT	TTATG-GTTT	GTTATGTGT	AGT-TGT---	GGTTTGGTCT	50
13-15RZA.DNA	1 AATATAGATA	TTGGTTATCA	GATG-ATTAA	TTTTT-A---	TTTTGAGTTA	50
14-3DZA.DNA	1 AATATAGGGG	TTGTG---CA	GGTGATGT-T	AAT-TTT---	GGATAGTTAT	50
14-7DZA.DNA	1 AATATAGAGG	ATGGGTAGGA	TTTGGATTAG	TATTAGA---	TTATTAATTT	50
		60	70	80	90	
10-12DZA.DNA	51 GTATTATG-G	T-GGTGA-GT	TATTGGATGT	ATAGTAATGA	CATTGACTGA	100
10-15DZA.DNA	51 TAGATTGATA	TA-GTTAGAT	-ACGATTAAT	GGTTTGTATA	TGTAAGTAGA	100
12-10RZA.DNA	51 TGATTGT-TT	TG-ATAGAGT	-GTAGTTTAG	ATTATA-TGT	TTGATTTTGT	100
12-11RZA.DNA	51 TGGTTATGAT	TG-GCTGTTT	TGTTTGGGAT	ACTATAATGA	TTTGT-TAT	100
12-1RZA.DNA	51 ATTCTTGATT	GT-GTAGGAT	-AGTATGTGA	GTTTCGATAG	TGTA---CAAG	100
13-10RZA.DNA	51 GAACTATGT-	TG-GTAGTGT	GAGTATACAA	AGATGAATGA	GATAGGGTGT	100
13-15RZA.DNA	51 TGA---AGTA	TTTTGGTGTG	TATGTGACCG	AAGTAAGTTG	TAGAAGAGAG	100
14-3DZA.DNA	51 TGATTGGGTA	TA-TTGATTT	GATTGCGTAC	A--TGATTGA	-ATACGATAG	100
14-7DZA.DNA	51 TGATTGAGTA	CATGTTATAG	AGTGTGGCAG	ACTC---TTG	TATACTATTG	100
		110	120	130	140	150
10-12DZA.DNA	101 --AGCCGGTG	TG-AAGGTAG	TTAGCCGATG	TAGAGTATAT	GCTATG-TCA	150
10-15DZA.DNA	101 TAATGTACTT	TGTAT---TG	TCTATAG-AG	ATGTGT-AAG	TT-ACTGTAT	150
12-10RZA.DNA	101 ATAT-TGTAG	TGATG---TTG	TTTTGAGA-TA	CG-AATAAAG	AT-TGGATGG	150
12-11RZA.DNA	101 CTATACATGA	TATGA---A	TGAGAGT-TG	AGTATGTAA	GT-TTGGTGT	150
12-1RZA.DNA	101 AATAGAATG	TGTAT---CTA	TGTGCGT-BA	AGTTGT-TAT	AT-GTT-TGT	150
13-10RZA.DNA	101 ATACGTATTG	TATGA---TTA	TTTGTATT-CA	TGTTTGTATA	CT-GTAACTT	150
13-15RZA.DNA	101 GTAGAGGTGT	AGATT---ACA	TTGTATAC-TG	TATTGTATTC	TTAGTTATGA	150
14-3DZA.DNA	101 ATGGGGGT-A	TGTGA---TAG	TTAGTPT-GA	TATTCTTTTA	TT--TGTTG	150
14-7DZA.DNA	101 TTTGTG-TGC	AG-TT---GAA	TAGTGAA-TA	CATT-AAIT-	-TAGT-GT-A	150
		160	170	180	190	200
10-12DZA.DNA	151 TGT-TACTAT	GTACTCTATA	AA-TGTT-CT	TAAAGTATT	TTTTGGTTGA	200
10-15DZA.DNA	151 TAAT-GTT-	ATCTAGGAGG	GGTAGTTCGA	TAGGAGGGGT	AGTTGGATAG	200
12-10RZA.DNA	151 TGTAAGGATG	ATGATTTCT--	-TGTGTTAAC	TATGTT-TCG	ATGTGTATTA	200
12-11RZA.DNA	151 CAGGTAGT-	GTATACITAA	TCATGTTAGT	TTTATAATCT	ATTTGCTGTA	200
12-1RZA.DNA	151 TACG-AIT-	GTTACTAGAT	TTTTTGTGTT	TACTTGTGTT	TTATTTGTTG	200
13-10RZA.DNA	151 TATGTGTA-	GTTATTAATG	GT-TGTTG-T	CATAGGGAGG	GTATGTTGTT	200
13-15RZA.DNA	151 TATCT-TTAT	AAATTTGTTA	TGGTAGTTAT	TGTTTGGGG	ATGGTAGGTA	200
14-3DZA.DNA	151 TGAGTAAGA-	ATATGTTATA	ATGTGTTGGC	TAGATAAAC	GGTTACTGTA	200
14-7DZA.DNA	151 TATCTGTTAT	ATGATAGTTA	CGATATTTAT	TTGATTATAT	AGGTTTGG-G	200
		210	220	230	240	250
10-12DZA.DNA	201 TGGGTATAGT	GTTAGTGT--	TGGTTTGTAT-	-G-TAAA-AT	GGGTTTGA	250
10-15DZA.DNA	201 GAGGGGTAGC	TGGGTGAAT	ACGGATAAGC	T-GTTAATGT	TGGCCTTGAA	250
12-10RZA.DNA	201 TCTATAAAT	ATAAAAATAT-	-CGTCTAAGC	G-GTTAGTAT	AGGTTTGGAA	250
12-11RZA.DNA	201 TATGTTGTTGT	GAGAAGGTTG	CGGTTACT-	G-TTGGAGAG	TGGTTTACCGA	250
12-1RZA.DNA	201 TAGAGTAGAC	ATGGTTA-C	CGTCTTTGT	T-ATAAATTT	GGGGTTATA	250
13-10RZA.DNA	201 GGTA-GTGT	ATACTGTATC	GGTAGCTGA	----AATTCG	--GTTATGAT	250
13-15RZA.DNA	201 TATGGTATGT	GGTTAAGGT-	-GCT-TATAG	G-TTATATTT	TGATTTGGAA	250
14-3DZA.DNA	201 GGTTTGAAT	GTFTTGTGT	TGGTAGATAA	G-GTAAATTTG	TAGAGGTA	250
14-7DZA.DNA	201 T-TAGTCACT	AGTAAAAGTT	TGGT-TTCCG	C-TTAAAATA	GGGTATGGAA	250
		260	270	280	290	300
10-12DZA.DNA	251 ATTTGTG-GA	AATTCGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAAATT	TGGTGGCCAG	300
10-15DZA.DNA	251 AAT-TTGGA	TAACTATGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TTGGGCTCG	300
12-10RZA.DNA	251 AATT-CGGAA	AGTTCTTTGTT	TCCGGAGGGG	CGTTCAAATT	TGGGGCCGGA	300
12-11RZA.DNA	251 A--T-TCGGA	AATGTGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TTGGGGCCCA	300
12-1RZA.DNA	251 GAAT-TCCGT	AAAGTTGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TCAGGGCCGG	300
13-10RZA.DNA	251 TTTT-CGAGA	AACTCTGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TCAGGGCCAG	300
13-15RZA.DNA	251 AITT-CT-GG	AACTGTGTT	TTGGGAGGGG	CGTTCAAATT	TGGGGCCGAA	300
14-3DZA.DNA	251 AAT-TCAGA	AAITTTGATT	TTGGGAGGGG	CGTTCAACTT	TCAGGGCCCA	300
14-7DZA.DNA	251 TTTT-CGAGG	AAATTTGATT	TTGGGAGGGG	CGTTCAAATT	TGGGACCCGA	300
		310	320	330	340	350
10-12DZA.DNA	301 AAT.....					350
10-15DZA.DNA	301 GAT.....					350
12-10RZA.DNA	301 AA.....					350
12-11RZA.DNA	301 GAT.....					350
12-1RZA.DNA	301 AAT.....					350
13-10RZA.DNA	301 AAT.....					350
13-15RZA.DNA	301 AAT.....					350
14-3DZA.DNA	301 ATT.....					350
14-7DZA.DNA	301 TTT.....					350

continuación figura 32

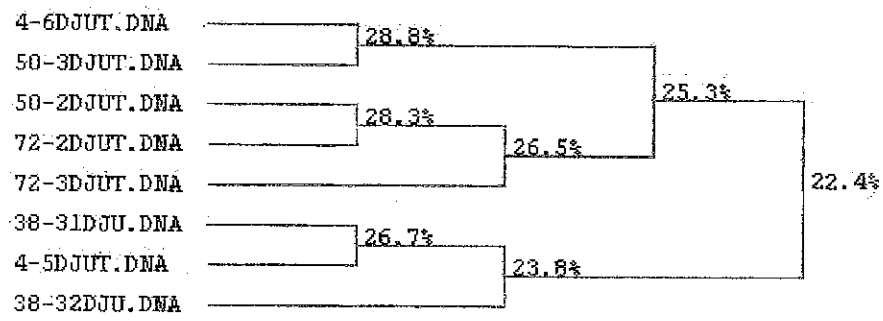


continuación figura 32

Jutiapa

	10	20	30	40	50	
38-31DJU. DNA	1 AATATAACCA	----GTGTGT	GGCTTAGGGT	TGGGCTTGCT	TATAGATGTT	50
38-32DJU. DNA	1 AATA----CA	----GCATGT	AGATGGTATT	TAAAGTTGAG	TATAGGTTTG	50
4-5DJUT. DNA	1 AATATAGT--	----ACCTGT	GGTGGTGAGC	TGTGTGTAAT	GGTAGATGGT	50
4-6DJUT. DNA	1 AATATA-GCA	TGGGATTGG	GATTAT-GGT	TTTGATTGG	TAATGTGTGA	50
50-2DJUT. DNA	1 AATATATACG	TTATGCATGC	AACGGTAGAA	TTGAGTTAAT	GGTTGTTTGG	50
50-3DJUT. DNA	1 AATATA-GAG	TGAGTTATCG	A--TGG-GAG	GTAAGTTATG	TACTTTG----	50
72-2DJUT. DNA	1 AATATAGGC-	TTGGGT-TAT	A--GGTTGGA	T----ATAAT	GGT-GTTATA	50
72-3DJUT. DNA	1 AATATA-GTG	TGGGGC-TAT	AGGTGTTG--	TTGA----AT	GGT-GT---A	50
	60	70	80	90	100	
38-31DJU. DNA	51 AT-TGT-ATG	TTTGTTCGGT	CTGGATGTGT	TATTCITAG-	TTATGTAGTT	100
38-32DJU. DNA	51 ATATGTTAGA	GGTG-TGTAT	TGTATTGTGT	GATGTATGT-	TGATCATAGT	100
4-5DJUT. DNA	51 AT-TGTTACA	GTAGAT-TGA	-TAGTTGTGT	AGGCTTAGA-	TTGTATTGTT	100
4-6DJUT. DNA	51 ATGA-TAGTA	GTGATGTTGT	TAGATCGTTT	ATGT----TC	TAGTGGTAG-	100
50-2DJUT. DNA	51 GTAT-GTGTA	GATAAAGTTG	TAGATTGTAT	GTGTGAGGTG	TAATGTTTAT	100
50-3DJUT. DNA	51 ATTC-TTATG	TT--TATGT	TTGTTTAGTT	GTGT----T-	TGGTATCAIT	100
72-2DJUT. DNA	51 ATGTAGTTTA	GTTATGTCTT	TAGTTTGAGT	ATG-GTAGTA	T--TGAT-GT	100
72-3DJUT. DNA	51 GTGAGTTTGT	ATTGTATGTG	TA--TTATGT	GTGTTATATT	TGATATCGAT	100
	110	120	130	140	150	
38-31DJU. DNA	101 ATGT-A-GTT	CATATTTCAT	TCACCACATA	GTATTATATA	AATTATATT-	150
38-32DJU. DNA	101 ACAG-GATAG	TAACGATGAG	GAGACTTAAG	TTATA--GTT	GATTCTGTG-	150
4-5DJUT. DNA	101 ATGA-ATGTA	TGTAAAC-T	GAAACATGAG	TTAGAAGGTG	AAAGTGGTT-	150
4-6DJUT. DNA	101 GAG-TGTGTA	GTGAAGATTT	GTTATTTGTT	GTGTATGTA	GTT-CTGTTA	150
50-2DJUT. DNA	101 GTGAGGTGTT	GTATATGGTT	AGTTAGAGTG	TTACTGAGTG	TAT-TTGTG-	150
50-3DJUT. DNA	101 GTG-TATATA	GTTTGGGTT-	GTGTGAGGAC	GTGAGAAGTG	GTTATTATAG	150
72-2DJUT. DNA	101 GTAGTATGTA	ACATAAAGTT	GATAGAGTG	GTGAGCAGTA	CAT-GATTA-	150
72-3DJUT. DNA	101 GTG-TGCATG	ACAAAGGAAT	GAG-AAAGAG	TTGAGTAAGG	TTT-TGTTAG	150
	160	170	180	190	200	
38-31DJU. DNA	151 CATAAATTTTC	-TTATAATGT	TATGTTATAT	AGTTTGTGT	TTAT--TATA	200
38-32DJU. DNA	151 TGTAATGTTA	GTAGTTGT-T	TATGTT-TGT	A-TAAGTTG-	--AT-GTAGG	200
4-5DJUT. DNA	151 GATA-CATTT	-TAATTGT-T	TATGTTG-AT	GATTATTIAG	TTGT-ATATG	200
4-6DJUT. DNA	151 TGTAGTATAA	TATATTATTG	AGCA-ATGGT	AGGAGGTGA	TGTTGATAGG	200
50-2DJUT. DNA	151 TTTGATAG--	TA---CAGTA	AGT-TTGTAG	GTATAGTT--	TGT---TATT	200
50-3DJUT. DNA	151 TGTGATAGAT	TATAGTATTT	AATTTGTACT	TTATAGTTCT	TATCCATTA	200
72-2DJUT. DNA	151 TATACT----	TA---GAGTT	ATTGTTAAGA	GTATAGTT--	TAG-AACATT	200
72-3DJUT. DNA	151 TTTGAGAG--	TG-ATGAAT	ATT-TAATAA	CTATAATTGT	TTG-AATATG	200
	210	220	230	240	250	
38-31DJU. DNA	201 TATGATATCG	GTAC-G-TC-	TTGTA-----	CGGTAAGA-	GTGGG-TTCG	250
38-32DJU. DNA	201 TAGGGTAGTT	GTTA-GATGG	TTACCGG-TT	ATTCIAAAAT	TTGGGGTTCA	250
4-5DJUT. DNA	201 TATAGTATAT	ATTT-GATC-	TGGTAGT-TC	TTGGTAAAT	GTGGT-CACG	250
4-6DJUT. DNA	201 TGGTG-----	--ATAAGTTG	CTGTA--AGT	-TG-TAAAAA	TAG-G-GTTG	250
50-2DJUT. DNA	201 TGCTGTTGTG	GTTATAGTTA	T---GTGGT-	ATGGTGCAAG	TTAGGGGTCA	250
50-3DJUT. DNA	201 TCATATTATA	ACATAAAATC	TTGTACTGGT	-TGGTGGTAA	AGGTG-GTTG	250
72-2DJUT. DNA	201 AATGATTACG	TTACTGGTTG	C---GTTATT	ATGGTGAAAA	T-GGGTATCG	250
72-3DJUT. DNA	201 TAT-ACAGTG	GTT-TGGTTA	TTG-GGTGTT	GCGGTTAAAA	TGGTGAGTTG	250
	260	270	280	290	300	
38-31DJU. DNA	251 AAAAAAT-TCG	GGAAAT-TTG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	ATTTGGGGCC	300
38-32DJU. DNA	251 GAAATT-CGT	GAAAGT-CTG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	ATTTGGGACC	300
4-5DJUT. DNA	251 GAGAA---AT	AAGAAT-TTT	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	ATTTGGGGCC	300
4-6DJUT. DNA	251 GAAATTATCT	GGAAAC-TTG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	CTTTTGGGGC	300
50-2DJUT. DNA	251 GAAATT-TAC	GGAAATCTG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	ATTTTGGCCG	300
50-3DJUT. DNA	251 AAGATT-TCT	GGAAATACCG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	CTTTTGGGGC	300
72-2DJUT. DNA	251 GAAATT-TGT	GGAAGT-CTG	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	CTTTTGGGGC	300
72-3DJUT. DNA	251 GAAAAAT-TGT	GGAA--TCTA	GTTTTGGGAG	GGGCGTTCAA	CTTTTGGGGG	300
	310	320	330	340	350	
38-31DJU. DNA	301 GAAAAA....	350
38-32DJU. DNA	301 GCAAAA....	350
4-5DJUT. DNA	301 GAAAAAT....	350
4-6DJUT. DNA	301 CAGAAT....	350
50-2DJUT. DNA	301 GAAAAAT....	350
50-3DJUT. DNA	301 CAGAAT....	350
72-2DJUT. DNA	301 GCAAAAT....	350
72-3DJUT. DNA	301 CCAAAAT....	350

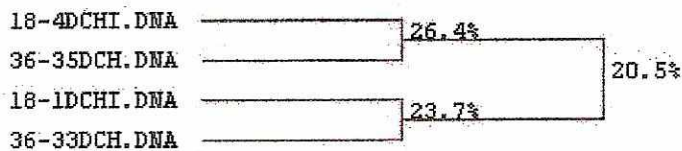
continuación figura 32



continuación figura 32

Chiquimula

		10	20	30	40	50	
18-1DCHI.DNA	1	AATATAGCGG	TTG-TACTTG	GATTG-GAAT	TAATGGTGT	GATTTAGTAT	50
18-4DCHI.DNA	1	AATATAGGTT	CGGGTGCCTA	GGTTAGGGG	TAGTAACAGA	A-TTTATAT	50
36-33DCH.DNA	1	AATATAGCA-	CTG-TTGTG	GTTTATGGAT	T--TGATAAA	GCCGTGGTGG	50
36-35DCH.DNA	1	AATATAGGTA	TTGGTGGGTG	TAGGTGGGAT	AAGT--TGAT	G-TTGTAGAT	50
		60	70	80	90	100	
18-1DCHI.DNA	51	TGT-GTTATG	AAGT-GTAAG	GTATGTAIGA	TTAGATAGTG	TGCTGTGAAA	100
18-4DCHI.DNA	51	TGTGASTAGA	TCGTATAGTT	ATGATTAGTT	TATATAAGTG	TGTATTCMTT	100
36-33DCH.DNA	51	T-T-ATTATG	ATGTAGTGT	CTATTGAGGT	TGTCTGATA	GAGAGTGGAT	100
36-35DCH.DNA	51	GGTTGGTGAA	TCGATGTGTT	A-AGTTGTTT	TATTGTGGTA	TAGAGTGTTT	100
		110	120	130	140	150	
18-1DCHI.DNA	101	GAATAGT-GA	AGAGAGTGAG	TAGAGT-TTC	--TTTGT-T	ATGTTAGTAG	150
18-4DCHI.DNA	101	GTATGGTTGA	AGTGAATATG	TTTAGTGGTA	TGTTCTT-AT	TGATTGTG-	150
36-33DCH.DNA	101	TAGTTGT-AG	ATTT-GTGAT	GTTAAT-TTA	--TTCATGAT	ACATTAATAG	150
36-35DCH.DNA	101	G-ATA-TTAT	GTTGATTGTG	TAC-GTAMTA	AGTTTTTCGT	TGGTGGATGG	150
		160	170	180	190	200	
18-1DCHI.DNA	151	ATCATTGTTA	-TACTTTTAG	TTATAATAITA	ATATGAGGGG	TTAAAGGTTT	200
18-4DCHI.DNA	151	AGTGAAGATG	GAAATT----	TTGTTATGGA	TAAGAATGAT	ATGTTGTTG	200
36-33DCH.DNA	151	ATTGTTTCTT	-AACTTATGT	ATGAGGGTAG	GTGTGGTACA	CTAGGTGTAT	200
36-35DCH.DNA	151	AGTGATAGTA	TAAGTTATGT	TTGTCTTGAA	TGTTGGTGT	GTAAGAGTTG	200
		210	220	230	240	250	
18-1DCHI.DNA	201	AAGGTGGGTG	TTG-TGGATA	CTTATGGGTT	ATAAAATTTT	CGGGAAAGTC	250
18-4DCHI.DNA	201	TATTCCTAAA	ACTGTGTAAA	TAAGTGGGT-	ACGGAAAAT	CGGAAAATCC	250
36-33DCH.DNA	201	GGTGIGG-TA	TTGATTAATA	CTTG-AGGTG	ATAAAATTTA	TGGGGGAAGT	250
36-35DCH.DNA	201	GAT-CATAGA	A-TGT-TGGT	TAAGTGGGT-	TTGGAAAAT	GTGGAGGGTT	250
		260	270	280	290	300	
18-1DCHI.DNA	251	TGGTTTGGG	AGGGCCGTT	AAATTTGGG	CCGGAAT..	300
18-4DCHI.DNA	251	GGTTTGGG	AGGGCCGTT	AAATTCAGG	GCCTAAAT..	300
36-33DCH.DNA	251	TGATTTGGG	AGGGCCGTT	AAATTTATGG	CGGAAAAT..	300
36-35DCH.DNA	251	GGTTTGGG	AGGGCCGTT	AACTTTGGG	GCGGAAT..	300

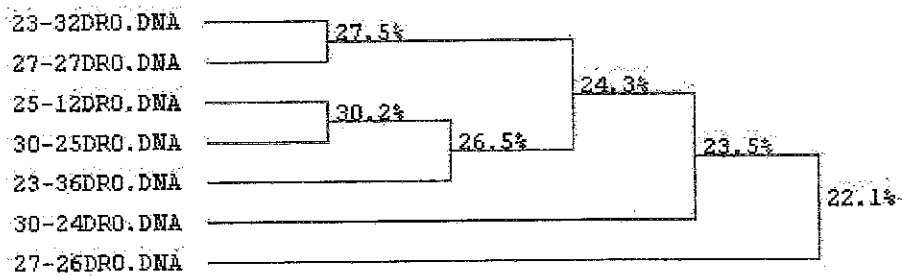


continuación figura 32

Santa Rosa

	10	20	30	40	50	
23-32DRO. DNA	1 AA-TATAGGC	TAAGTCTTAT	TTCGAAATTT	GTCGATTTGT	GIATTT-ATG	50
23-36DRO. DNA	1 AA-TATACA-	-GTCGGTAT	AGATGA	GTCGAGTGT	TATTTT-GAT	50
25-12DRO. DNA	1 AA-TATAGT-	-ATTGGTACT	ACCTGA----	GIATT-GITT	GGATTA-GTT	50
27-26DRO. DNA	1 AA-TATAGG-	-AATTGTTAT	GG-TGTGTT	ATTCGATAA	TTTAGATTTG	50
27-27DRO. DNA	1 AACTATAAGC	TGGATGGTAT	TGTT-ACTTT	TTGTTAGTTA	GAATTG-GTC	50
30-24DRO. DNA	1 AACTATAGCA	TA-----CTAG	GCTTGTGTAT	TAATAAATTT	GAATTGTGAC	50
30-25DRO. DNA	1 AA-TATAGG-	-AAGTTTAAA	GCTTAT----	G-GTT-TAAT	AGTTTA-TAT	50
	60	70	80	90	100	
23-32DRO. DNA	51 -AATGTTAGT	AACGAAATGA	GTTGATTAGT	AGAGTTTGT	TGGTAG-GA	100
23-36DRO. DNA	51 TTGA-TTGA	TAGAGTGA	GTAATGTT-G	TCATATACTG	TGGTGATAAG	100
25-12DRO. DNA	51 TAGGATTTGA	TTTAGATTTG	GTAATGTTAG	AGGTAT-CAA	CGGTGAAAAG	100
27-26DRO. DNA	51 TATATTTGTA	TTTGTTAGAG	ATGAGTTAG	TGGTG--AG	TAGTATAGAG	100
27-27DRO. DNA	51 TAGTGTAGAT	TATGACATGT	GTTATGTACA	AGCTTTGAAT	TGGTATAGG	100
30-24DRO. DNA	51 TAGAATGTGG	TGAGGATAGG	ATACAGC-AG	AGGAGTATGT	TT-TA-AAA	100
30-25DRO. DNA	51 CAGATCTTGA	AATGGTTCAT	G-ATTTGTAG	TGAGT-TA-	TAACGTCAAG	100
	110	120	130	140	150	
23-32DRO. DNA	101 TTTGTTTTAT	GTACGTTGAT	TAGATTTGAA	TG-TATTA-A	GTATATATGT	150
23-36DRO. DNA	101 A----ATAGA	CATGGATTAG	TAAGTCAGTA	TAGATTAT-T	CTGTTAT--A	150
25-12DRO. DNA	101 TTT-TGTGAC	AGTGGATTTAT	AGAAATGATG	TTATGTAT-T	ATGTTATTGA	150
27-26DRO. DNA	101 ATTGT-----T	AGTGTGTTAT	GATACATTTA	TTTGTATAGAT	A-ACTACGTT	150
27-27DRO. DNA	101 ATAGTATAGA	GTTGAAATAC	TATGTTTTAG	TT-TGTTA-T	GTTTGAATGT	150
30-24DRO. DNA	101 TGTGTGGTAG	ATTTGTGTAG	TTGATGTATG	AAGAGTATAT	ATGTTATAGT	150
30-25DRO. DNA	101 T-----G-GAG	AGTATGTTGT	ACAGTTTG-G	TT-TGATT-T	ATTTGATTTA	150
	160	170	180	190	200	
23-32DRO. DNA	151 TTGTAAGAGG	-----GIATGAT	ATAGGTA-TG	GIATAGGTGG	TT--ATAATC	200
23-36DRO. DNA	151 GTTTGTTTTG	TTGCTACTGT	TATACTGTTT	ATTTCA-ATTT	AGAGGTATGA	200
25-12DRO. DNA	151 TT-TGTGTTA	TTA-TATTAAT	GCTATAAATC	GTTGGTATGG	TGGTGTAAAGG	200
27-26DRO. DNA	151 AAATGTTATA	ATGGTATAG-	GTCGGTATA	GGATACATGG	TAG-GTTTG-	200
27-27DRO. DNA	151 ATGTATATAG	TTTGTATGGT	AAGATTA-TG	G-GTGGTTG	TGG-ATTGGT	200
30-24DRO. DNA	151 TTATGTTTTAT	TAAGTGTGAG	GTTGTTGATT	ACTGTGATG-	TGTGGTGTGG	200
30-25DRO. DNA	151 TTCTGATTTA	TTA-TATTAAT	G-TATTA-TT	ATGAATATGT	TAGGGTGTAT	200
	210	220	230	240	250	
23-32DRO. DNA	201 TGAATTC----	TTGATAATTT	GTTATA-ATA	GGTAGGTCA-	-GAAATTCGG	250
23-36DRO. DNA	201 TAAGGTAGTA	TAGGTTTATTT	TTTGGTACGC	TTATGATCCT	GAAAAATCAG	250
25-12DRO. DNA	201 TAGT-GCATT-	TAGGTTGCTT	GA-GTAGAAA	ATAGGGTTAG	AAAAATTCGG	250
27-26DRO. DNA	201 TAGTAGGTTG	CT-TCCGTT	GTTATAGGTT	G-AGGTTAT	-AATTTTGTG	250
27-27DRO. DNA	201 TAAGGTGAGA	TTGTTGGGCT	GACAGATATT	TGAAGTTT-	-AAATTTCTG	250
30-24DRO. DNA	201 TAGTAT-----	TTGTTTTGTT	ATTGGTGTAT	TTTGGTACTA	AAAAATTCCTG	250
30-25DRO. DNA	201 TGGTTGGTTG	TGGTTTGTGA	AC-ATAAAAT	GGTGGTTAG	AAAAACT-G	250
	260	270	280	290	300	
23-32DRO. DNA	251 TAAACTTTGA	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGACCTG	CAAAA.....	300
23-36DRO. DNA	251 AAAACTCG-G	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGCCG	CAATTT.....	300
25-12DRO. DNA	251 GAAACTC-TG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGACCC	AAAAAT.....	300
27-26DRO. DNA	251 GAAAGTTAGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAC	TTTTGGGTCC	GGATT.....	300
27-27DRO. DNA	251 GATTTCTTGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAGA	TTTTGGGCCG	CAAAA.....	300
30-24DRO. DNA	251 GGAATTTTGG	TTTTGGGAGG	GGTGTTCAGA	TTTTGGGCCG	AAAAAT.....	300
30-25DRO. DNA	251 GAAATTTTGTG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGCCC	GAATTT.....	300

continuación figura 32



3. Determinación de la variabilidad génica entre las regiones hipervariables clonadas del minicírculo del ADN cinetoplasto (kDNA) entre aislados de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) de distintos departamentos.

En la figura 32, se mostraron los diagramas de similitud de los diferentes aislados de cada departamento. De estos diagramas se escogió un clon de cada pareja agrupada por similitud, para hacer el análisis de alineación múltiple, por el método de Higgins-Sharpe, entre aislados de distintos departamentos. Para determinar si existe flujo genético entre aislados de *T. cruzi* se comparó el departamento de Jalapa con cada uno de los demás departamentos (*vid* figura 33). La razón por la que se escogió el departamento de Jalapa, como base, es porque es el único departamento que colinda con cada uno de los departamentos en estudio.

Por otro lado, se escogió un clon de cada departamento, y la secuencia de la cepa Y Brazil de *T. cruzi*, publicada en GenBank; para analizarlas por el método de Higgins-Sharpe (*vid* figura 34), y por el método de Lipman-Pearson (*vid* cuadro 10) utilizando el “software” DNAsis (Hitachi).

Figura 33

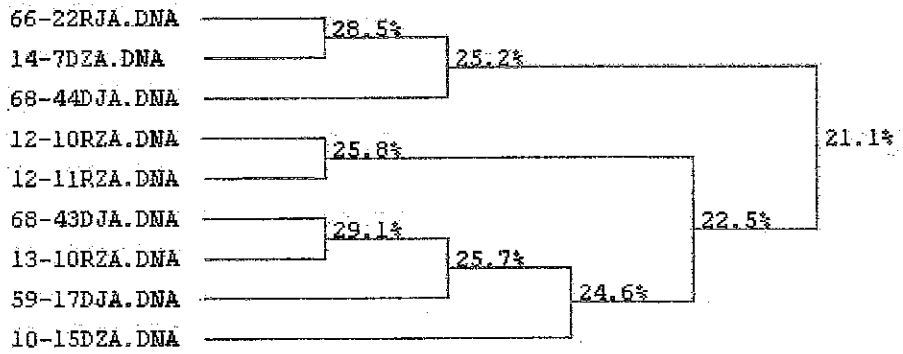
Alineación de secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo de los clones de los aislados de Jalapa con los clones de los aislados de distintos departamentos endémicos, así como su diagrama de similitud.

Las secuencias se muestran en orientación 5'-3'.

Jalapa-Zacapa

	10	20	30	40	50	
59-17DJA. DNA	1	TTGGGTGTGG	TGATAGAGTA	TAGGTGTAG-	-GAATTTATA	50
66-22RJA. DNA	1	AATATAAGG- -AATTC-	-TTTATGAT	GA-T-TTAG	AGTATTGATT	50
68-43DJA. DNA	1	AATATAGGAT	TAGTA-CGG	TGAGTGAA-G	GTTATATGT-	50
68-44DJA. DNA	1	AATATAAGG- -G-CAGTGG	TATA-ATAIT	AT-TAAGAT	GGTATTAGTA	50
10-15DZA. DNA	1	AATATAACA-	TAATGGTTAG	TGAATG-GTA	GACTTGTATG	50
12-10RZA. DNA	1	AATATAGTGT	-CGCGGATA	TAA-TGAATT	TGGGTGTG-G	50
12-11RZA. DNA	1	AATATAGGTT	-GTGGGGTG	-GG-TGGGCT	AGAGTACCTG	50
13-10RZA. DNA	1	AATATAGCAT	TTATGGTTTG	TTATTTGTGTA	GTTGTG-GT-	50
14-7DZA. DNA	1	AATATAGAG-	-GATGGGTAG	GATTTGGATT	AG-TATTAG	50
		60	70	80	90	100
59-17DJA. DNA	51	TGATAGTTTT	AG-TGAGTG	TATPATAGTG	AT-GGTATAG	AGGATGTGAT
66-22RJA. DNA	51	T-GITTTGAAT	ATGTTTATAG	TAG-AGTGTG	GCAGAC-TCT	TATGTACTA-
68-43DJA. DNA	51	TGACAGTTGT	ATATTCAAGA	CATAAAGATG	GTAGGTGTTT	GTTGTAGTGA
68-44DJA. DNA	51	T-GTTATAGT	TTGTTTCTCG	TATTAGTGAA	TGEAGT-ITC	AACAAGAGGA
10-15DZA. DNA	51	TGATATAGTT	AGATACGATT	AATGGT-TT	GTTAATGTA-	AGTATAGATA
12-10RZA. DNA	51	TGATTGTTTT	-GATAGAGTG	TA-GTT-TA	GATTATATGT	TTGATTTTGT
12-11RZA. DNA	51	TG-TGGTTAT	-GATGGCCG	TTTGTGTT-TG	GGATAC-TAT	AATGATTTGT
13-10RZA. DNA	51	CTATGTTGGT	AGTGTGAGTA	TACAAAGATG	AATGAGATAG	GGTGTG-TAC
14-7DZA. DNA	51	TTGATTTGAGT	ACAT--GTTA	TAG-AGTGTG	GCAGAC-TCT	TGTATACTAT
		110	120	130	140	150
59-17DJA. DNA	101	GTAG-TATGA	G-T-TAGAA	GC-GAGAT-	AGAAAT-TT	GT-TTAGATT
66-22RJA. DNA	101	-GTTTGLAT	GCAGTGTGTT	GTAGTATAGT	TGTAATTTGTG	CCGTGTATAT
68-43DJA. DNA	101	ATGT-TATA-	GTT-TGTCTG	GT-TAAGTT-	TGTAAGT-TG	GTGTTAAACT
68-44DJA. DNA	101	G-GTAGTGA	AGAGT-TAGT	-TAGTAAAGTG	AATGA-TGTG	TTATTAATGT
10-15DZA. DNA	101	GTAC-TTTGT	ATT--GTGT	AT-AGAGATG	TGTAAGT-TA	CTGT--ATT
12-10RZA. DNA	101	ATAT-TGTA-	GTGATGTTGT	TTGAGATACG	AATAA---A	G-ATTGGATG
12-11RZA. DNA	101	TTATCTATAC	ATGATAT-GA	ATCAGAGTTG	AGTGTG-TA	A-GTTTGGTG
13-10RZA. DNA	101	GTAT-TGTAA	GAT-TATTGT	AT-TCATGT-	TGTA-T-TA	CTGTATCTTT
14-7DZA. DNA	101	T-GTTTGTGT	GCAGT-TGA-	ATAGTGAATA	CATTAAATTA	GTGTATATCT
		160	170	180	190	200
59-17DJA. DNA	151	GT-TTATGTT	ACCTAATGTT	TGTTATCTAA	GGTT-GAATG	GTATGTAAGT
66-22RJA. DNA	151	ACITT--GAT	--CTA----	TGTTATATAT	T-ATTTGT-T	AATTATG-AT
68-43DJA. DNA	151	GTATTATATT	GTTTATTGGT	TGGTGT--A	GTTG-GGTTG	GTGCTA-TGT
68-44DJA. DNA	151	-TGATAAGTA	TATTA----	AGTT-TATAA	ATGTTCCCTAT	AACITGTG--
10-15DZA. DNA	151	A-ATGTTATC	TAGGAGGGGT	AGITGGATAG	GAGG-GGTAG	TTGTGATAGGA
12-10RZA. DNA	151	GT-GTACGAT	G-ATGATTCC	TTGTGTTAAC	TATGTT-TCG	ATGTGTATTA
12-11RZA. DNA	151	TCAGTGTAGT	GTATCTTAA	TCATGTTAGT	TTCAATACT	ATTTCCTGTA
13-10RZA. DNA	151	ATGTGTGAGT	TATTAATGTT	TGTTGTC--A	-TAG-GGAGG	GTATG-TGT
14-7DZA. DNA	151	GTATATATGAT	AGTTA----	CGATATTTAT	TTGATATAT	AGGTTTGG
		210	220	230	240	250
59-17DJA. DNA	201	TGA-TAGTG-	TGCTGGT-TT	GGAGTATGTG	GTAGGTTTAA	GGGTTAAAAA
66-22RJA. DNA	201	TGTATAGGTA	GTGGATGGTT	GTAAGTGA-G	GTGGAAATGG	TGTGTA AAAA
68-43DJA. DNA	201	TTG-T-GTGG	TATTG--CT	GTAATTTGTG	GT-----	-ATTAAAAA
68-44DJA. DNA	201	TGGATGGGTT	GTATAGGTTT	-TGAT--G	GTTAAATGA	GGTCCGAAA
10-15DZA. DNA	201	GGGTAGCTG	GGTGAAT-TA	CGGATAAGCT	GTTAATGTTG	CCCTGGAAAA
12-10RZA. DNA	201	TGTATAAACT	ATAAAATAG	GTC-TAAGGG	GTTAGTATAG	GTTTGGAAAA
12-11RZA. DNA	201	T-TATGGTTG	TGAGAAGGTT	CGGATACT	GTTGGAGAGT	GGTACCGGAA
13-10RZA. DNA	201	TGG-TAGTGG	TAT-A--CT	GTATCTGGTA	GCTGAAATTC	GGTATGATT
14-7DZA. DNA	201	TTAGTCACTA	GTAAGAGTTT	G-GTTTCG-G	CTTAAATAG	GGTATGGAAT
		260	270	280	290	300
59-17DJA. DNA	251	TTTCG-GAAG	C-CTGGTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTT	GGTCCGGATT
66-22RJA. DNA	251	TTT-GAGAAA	CTTGTGTTTA	GGGAGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCGGAAAA
68-43DJA. DNA	251	TT-CGAGAAA	C-CTGGTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTT	GGGCCGAAA
68-44DJA. DNA	251	TTTCCAGAAA	GCTG-ATTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGAAA
10-15DZA. DNA	251	ATTTGGATAA	CTATG-TTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTT	GGGCTCGGAA
12-10RZA. DNA	251	-TTCCGAAA	TTCTTGTTC	GGGAGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGAAA
12-11RZA. DNA	251	-TTCCGAAA	TGTTGTGTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTT	GGGCCGAAA
13-10RZA. DNA	251	TTTCGAGAAA	CTCTGGTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTT	AGGCCGAAA
14-7DZA. DNA	251	TTTCGAGGAA	ATTTGATTTT	GGGAGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGATT
		310	320	330	340	350
59-17DJA. DNA	301	T.....
66-22RJA. DNA	301	T.....
68-43DJA. DNA	301	T.....
68-44DJA. DNA	301	T.....
10-15DZA. DNA	301	T.....
12-10RZA. DNA	301	T.....
12-11RZA. DNA	301	T.....
13-10RZA. DNA	301	T.....
14-7DZA. DNA	301	T.....

continuación figura 33

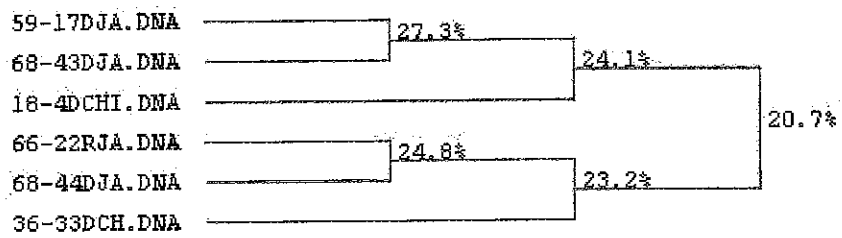
Jalapa-Zacapa

continuación figura 33

Jalapa-Chiquimula

		10	20	30	40	50	
18-4DCHI.DNA	1	AATATAGGTT	CGGGTGCCTA	GGGTTAG--G	GGTAGTAACA	GAATTTTATTA	50
36-33DCH.DNA	1	AATATAGCAC	TGTTGTGGT	TTAATGGATT	GATAAAGGCG	TGGTGGTT-A	50
59-17DJA.DNA	1	AATATAGACT	TGGGTGTGGT	GA-TAGA--G	TATAGGTGTA	GGATTTTATA	50
66-22RJA.DNA	1	AATATAAGG-	-AAITGTTTA	TGATGATTTA	GA--GTATG	ATTTGTTTGA	50
68-43DJA.DNA	1	AATATAGGAT	TAG-TACGGT	GAGTGAA--G	GTTATATGTT	GTATGTTG-A	50
68-44DJA.DNA	1	AATATAAGGG	CAGTGGTATA	ATATTATTTA	GATGGTATTA	GTATGTTATA	50
		60	70	80	90	100	
18-4DCHI.DNA	51	TTGTGAG-TA	GATCGTATA-	GTTATGATTA	GTTTATATAA	GTGTGTATTC	100
36-33DCH.DNA	51	TTATGATGTA	GTGACTATT	GAGGT--TGT	GCTGATA-GA	GAGTGGATTA	100
59-17DJA.DNA	51	TGATAGT-TT	TAGTGAGTGT	ATTATAGTGA	TGGTATA-GA	GGATGTGATG	100
66-22RJA.DNA	51	ATATG-TTTA	TAGTAG-AGT	GTGGCA-GAC	TCTTATGTAC	TAGTTTGTAT	100
68-43DJA.DNA	51	TGACAGT-TG	TA-TATTCAA	GACATAAAGA	TGGTA----G	GTGTTTGTTG	100
68-44DJA.DNA	51	GTTTG-TTTC	CTGTATTAGT	G-AATG-TAG	TTTCA-ACAA	GAGGAGGTTA	100
		110	120	130	140	150	
18-4DCHI.DNA	101	TTTGTATG-G	TTGAAGTGAA	TATGTTTAGT	GGTATGTTC	TATTGATT--	150
36-33DCH.DNA	101	GTIG-TAGAT	TTGTGATGTT	-AATTTATTC	ATGATACATT	AATAGATTGT	150
59-17DJA.DNA	101	TA-GTATGAG	TTAGAATG--	CGAGATAGAA	ATTTTGTTTA	GATTGTTTAT	150
66-22RJA.DNA	101	GC-A-GTGTG	TTGTAGTATA	-GTTGTAATT	GTGGCGTGA	TATACTTTGA	150
68-43DJA.DNA	101	TA-GTGAATG	TTATAGTT--	TGTCGTGTTA	AGTTTGT--A	AGTTG---GT	150
68-44DJA.DNA	101	GT-G-AAGAG	TTAGTTAGTA	-AGTG-AATG	ATGTGTTATT	AATGTTGATA	150
		160	170	180	190	200	
18-4DCHI.DNA	151	GTTGAGTGAA	GATGGAAATT	TTGTTA-TGG	ATAAGAATGA	TATTGTTGTT	200
36-33DCH.DNA	151	TTCTTAACCT	A-TGTATGAG	-GGT-AGGTG	TGGTAGACTA	GGT--GTATG	200
59-17DJA.DNA	151	GTTACCTAAT	GTT-TGTTAT	CTAAGGTGA	ATGGTATGTA	TGTTGATAGT	200
66-22RJA.DNA	151	TCTATGTTAT	A-TAT-TATT	-TGTTAATTA	TGATTGTTATA	GGT--AG--T	200
68-43DJA.DNA	151	GTTAACTGT	ATTATATGTT	TTATTGGTTG	GTGTTAGTTG	GGTTGGTGT	200
68-44DJA.DNA	151	AGTATATTA	G-TTTATAAA	-TGTTT-CTA	TAACTGTGTG	GAT--GGGTT	200
		210	220	230	240	250	
18-4DCHI.DNA	201	GTATTC-TTA	AAACTGTGTA	AATAAGTG-G	GTACGGAAAA	TT-CGGAAAA	250
36-33DCH.DNA	201	GTGTGGTATT	GATTAACTACT	-----TGAG	GTGATAAAAT	TTATGGGGGA	250
59-17DJA.DNA	201	GTGCTGGTTT	GGAGTATGTG	GTAAGGTTAA	GGGTTAAAAA	TT-TCG-GAA	250
66-22RJA.DNA	201	GGATGGTTGT	AAGTGAGGTG	GAAA--TGGT	GTGTA-AAAT	TT-TGAGAAA	250
68-43DJA.DNA	201	ATGTTTGTGT	GGTAT-TGCT	GTAATTTGTG	GTATTTAAAA	TT-TCGAGAA	250
68-44DJA.DNA	201	GTATAGGTTT	TGAT--GGTT	AAAA--TGAG	GTCCGGAAAT	TT-CCAGAAA	250
		260	270	280	290	300	
18-4DCHI.DNA	251	TCCGGTTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTT	AGGGCCTAAA	T.....	300
36-33DCH.DNA	251	AGTTGATTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTA	TGGCCGAAAA	T.....	300
59-17DJA.DNA	251	GCCTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTT	GGGTCCGATT	T.....	300
66-22RJA.DNA	251	CTTGTGTTTA	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGAAAA	T.....	300
68-43DJA.DNA	251	ACCTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAACTTTT	GGGGCCGAA	T.....	300
68-44DJA.DNA	251	GCTG-ATTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGCAA	T.....	300

continuación figura 33

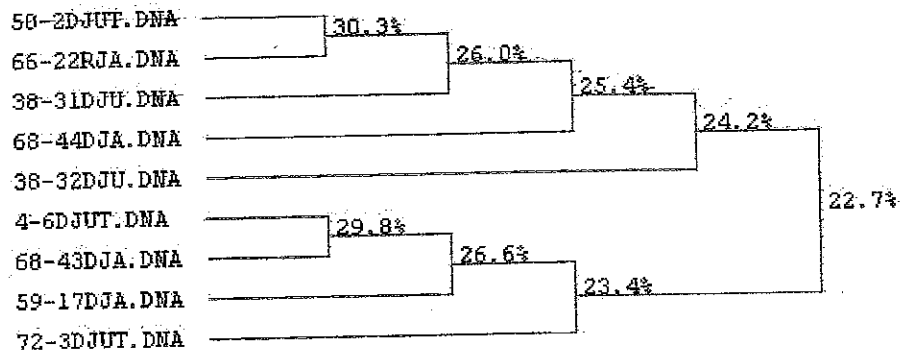
Jalapa-Chiquimula

continuación figura 33

Jalapa-Jutiapa

	10	20	30	40	50	
38-31DJU. DNA	1 AATATAACCA	GIG--TG-TG	GCTTAGGGIT	GGGCT--TGC	TTATA-GATG	50
38-32DJU. DNA	1 AATACAGCAT	GTAGATGGTA	TTTAAAGTIG	AGTATAGGTT	TGATATGTTA	50
4-6DJUT. DNA	1 AATATAGC-A	TGGGATTT--	GGGATTA--T	GGTTTIGATT	TGGTAAATGIG	50
50-2DJUT. DNA	1 AATATATACG	TTA--TG-CA	TGCAACGGTA	GAATTG-AGT	TAATG-GTTG	50
59-17DJA. DNA	1 AATATAGA-C	TTGGGTGT--	GGTGATA--G	AGTATAGGIG	TAGGAATTTA	50
66-22RJA. DNA	1 AATATAAGGA	AT---TG-TT	TATGATGATT	TAGA-G-TAT	TGAT---TTG	50
68-43DJA. DNA	1 AATATAGG-A	TTAGTACG--	GTGAGTG--A	AGGTT--ATA	TGTTG-TATG	50
68-44DJA. DNA	1 AATATAAGGG	CAG--TGGTA	TAATATTATT	AAGATGGTAT	TAGTA---TG	50
72-3DJUT. DNA	1 AATATAGT-G	TGGGGCTATA	GGTGTG--T	TGAAT-GGTG	TAGTGA-GTT	50
	60	70	80	90	100	
38-31DJU. DNA	51 TTATTGTATG	TT-TGTTGC-	GTCGGATGT	GTTATTC-TT	A-GTTAT-GT	100
38-32DJU. DNA	51 GAGGTGTGTA	TIGIATGTIG	TGATGTATGT	TGATCATAGT	ACAGGATAGT	100
4-6DJUT. DNA	51 TGAATGATAG	TAGTGTATGT	GTTAGATCGT	TTATGTTCTA	GTGGTAGGAG	100
50-2DJUT. DNA	51 TTTGGGTATG	TG-TAGATAA	AGTTGTAGAT	TGTATGT-GT	GAGGTGTAAT	100
59-17DJA. DNA	51 T--ATGATAG	TTTTAGTGAG	TGTATTATAG	TGATGGTATA	GAGG-ATGTG	100
66-22RJA. DNA	51 TTTGAATATG	TT-TATAGTA	GAGTGTGG--	CAGACTC-TT	ATGTACTAGT	100
68-43DJA. DNA	51 TTGATGACAG	TTGT-ATATT	--CAAGACAT	AAA-----G	ATGGTAGGIG	100
68-44DJA. DNA	51 TTATAGTTTG	TT-TCCGTGA	--TTAGTGA	TGTAGTT-TC	AACAAGAGGA	100
72-3DJUT. DNA	51 TTGATTGTAT	GTGTATTATG	TGTTTATAT	T--TGATAT-	-CGATGTGIG	100
	110	120	130	140	150	
38-31DJU. DNA	101 AGTTATGTAG	TTCAATTATTC	ATTCAACCACA	TAGTATTATA	TAAATTATAT	150
38-32DJU. DNA	101 AACGATGAGG	AGACTTAAGT	TATAGTTGAT	T-CTGTG-TG	TAATGT-TAG	150
4-6DJUT. DNA	101 TGTGTAGTGA	AGATTGTGT--	TATTTGTGT	TGTA-TGTAG	TTCTGTATTG	150
50-2DJUT. DNA	101 GTTTAATGTGA	GGTGTGTGA-	TATGGTTAGT	TAGAGTGTTA	CTGAGTGTAT	150
59-17DJA. DNA	101 -ATGTAGTA-	TGAGTTAG--	AATGCGAGAT	AGAAATTTTG	TTTAGATTGT	150
66-22RJA. DNA	101 TTGTATGACG	TGTGTGTGAG	TATAGTT-GT	AATTGTGGCG	-TGATATATAC	150
68-43DJA. DNA	101 TTTGTGTGAG	TGAAT-GT--	TATAGTTGT	CGTG-T-TAA	GTTTGTAGT	150
68-44DJA. DNA	101 GGTTA-GTGA	AGAGTTAGTT	AGTAAAGTGA	TGATGTGTTA	TTA---ATGT	150
72-3DJUT. DNA	101 CATGACAAAG	GAATGAGA--	AAGAGTTGAG	TAAGGTTTTG	-TTAGTTTTGA	150
	160	170	180	190	200	
38-31DJU. DNA	151 TCATAAATTT-	TCMTATAATG	T-TATGTTA-	TA-TAGTTTTG	TTGTTTTATA	200
38-32DJU. DNA	151 TAGTTGTTTA	TGTT----TG	TATAAGTTGA	TG-TAG----	--GTAGGTA	200
4-6DJUT. DNA	151 TAGTATAATA	TATTATTGAG	CAATGGTAGG	AGGTGATGT	TGATAGG--T	200
50-2DJUT. DNA	151 TTGTGTTTGA	TAGTACAGTA	AGTTTGTAGG	TA-TAGTTTTG	TTATTTGCTG	200
59-17DJA. DNA	151 TTATGTTACC	TAATGTT---	TGTTATCTAA	GGTTGAATGG	TATGTATGTT	200
66-22RJA. DNA	151 TT-TGATCTA	TGTTATAAT	TATTTGTTAA	T--TA--TGA	TTGTATAG-G	200
68-43DJA. DNA	151 TGGTGTAA	CTGTATT--A	TATTTGTTAT	TGGTTGGTGT	TAGTTGGGTT	200
68-44DJA. DNA	151 TGATAA----	--GTATAATA	AGTTTATAAA	TG-TT-CCTA	TAACTGTGTG	200
72-3DJUT. DNA	151 GAGTGATGAA	T--TATTTAA	TAACTATAAT	TGTTTGA--A	TATGTATAC-	200
	210	220	230	240	250	
38-31DJU. DNA	201 TATATGATAT	CGGTACGCT	TGTACGGTA	AGAGTGGGT-	TCGAAAAATT	250
38-32DJU. DNA	201 GTTGTGA-GA	TGGT-TACCG	GTTATCTAA	AATTTGGGGT	TCAGAAATTC	250
4-6DJUT. DNA	201 GGTGATAAGT	TGCTGTAA--	---GTTGT-A	AAA-AIAGGG	TTGGAAAITA	250
50-2DJUT. DNA	201 TT-GTGGTIA	TAGT-TATGT	GGTATGGTGC	AAGTTAGGGG	TCAGAAATTT	250
59-17DJA. DNA	201 GATAGTGTGC	TGGTTTGGAG	TATGTGGT-A	AGGTTAAGGG	TTAAAAAIT-	250
66-22RJA. DNA	201 TA-GTGG--A	TGGT-TGTA-	AGTCAGGTGG	AAAT--GGTG	TGTAAAAATT	250
68-43DJA. DNA	201 GGTGCTATGT	TTGTGTGGTA	T-TGCTGT-A	ATTTGTGGTA	TTAAAAAIT-	250
68-44DJA. DNA	201 GATG-GGTTG	TA-TAGGTTT	TG-ATGGTTA	AAATGAGGTG	-CGGAAATTT	250
72-3DJUT. DNA	201 AGTGGTTTGG	TTATTTGGTG	T-TGCGGTTA	AAATGGTGAG	TTGGAAA--A	250
	260	270	280	290	300	
38-31DJU. DNA	251 CCGGAAATTT	G-GTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AAATTTGGGG	CCGAAAAA..	300
38-32DJU. DNA	251 GTGAAAGTCT	G-GTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AAATTTGGGA	CCGAAAAA..	300
4-6DJUT. DNA	251 TCTGAAACTT	TGGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AACTTTTGGG	GCCAGAAAT..	300
50-2DJUT. DNA	251 ACCGAAATTC	TGGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AGATTTTTGGC	CCGAAAAAT..	300
59-17DJA. DNA	251 TC-GGAAGCC	TGGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AACTTTTGGG	TCCGAAIT..	300
66-22RJA. DNA	251 TGAGAAACTT	GTGTTTTAGG	AGGGGCGTTC	AAATTTGGGG	CCGAAAAAT..	300
68-43DJA. DNA	251 TCCAGAAAC	TGGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AACTTTTGGG	GCCGAAAT..	300
68-44DJA. DNA	251 CCGAAAGCT	G-ATTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AAATTTGGGG	CCGCAAAAT..	300
72-3DJUT. DNA	251 TTGTGGAATC	TAGTTTTGGG	AGGGGCGTTC	AACTTTTGGG	GGCCAAAT..	300

continuación figura 33

Jalapa-Jutiapa

continuación figura 33

Jalapa-Santa Rosa

		10	20	30	40	50	
23-36DRO. DNA	1	AA-TATACAG	TGTGGTA-TA	GA-TGAGTGT	GAGT---GTI	ATTIT--GAT	50
25-12DRO. DNA	1	AA-TATAGTA	T-TGGTACTA	CC-TGAGTAT	TGTTTGGATP	AGTTTAGGAT	50
27-26DRO. DNA	1	AA-TATAGGA	ATTGITA-TG	GNGTGTITAT	TTCGATAAIT	TAGAT-TTGT	50
27-27DRO. DNA	1	AACTATAAGC	TG-GATGGTA	TTGTTACTTTT	TTGTTAGTGA	GAATTGGTCT	50
30-24DRO. DNA	1	AACTATAGCA	TAC--TAG--	GCTTGTGTAT	TAATAAAITTT	GAATTGTGAC	50
59-17DJA. DNA	1	AA-TATAGAC	TTGGGTG-TG	GTGA-TAGAG	TATAGGTGTA	CGAAT-TTAT	50
66-22RJA. DNA	1	AA-TATAAGG	AAT--TGT--	TTATGATGAT	TTAGAGTATP	GATTTGT---	50
68-43DJA. DNA	1	AA-TATAGGA	TTAG-TA-CG	GTGAGTGAAG	GTTATATGTT	GTATG-TTG-	50
68-44DJA. DNA	1	AA-TATAAGG	-GCAGTGGTA	T----AATAT	TATTAAGATG	GTATTAGTAT	50
		60	70	80	90	100	
23-36DRO. DNA	51	TTGATTGATA	GAGTGTAGTA	ATGT-T--GT	GATATACTGT	GGTGATAAGA	100
25-12DRO. DNA	51	TTGATT--TA	GATTGT-GTA	ATGT-TA-GA	GGTAT-CAAC	GGTGAAAAGT	100
27-26DRO. DNA	51	ATA----TTG	TGATT-TGTT	AGAGATGAGG	TTAGTGGTGA	GTAGTAGATA	100
27-27DRO. DNA	51	AGTGTAGATT	ATGACATGTG	TTATGTACAA	GCTTTGAAIT	CGTGATAGGA	100
30-24DRO. DNA	51	TAGAATGTGG	TGAGGATAGG	ATACAGCAGA	GGAGTATGTT	TTAAAATGTG	100
59-17DJA. DNA	51	ATGATAGTIT	TAGTG-AGTG	TATTAATAGT	ATGGTATAGA	GGATGTGATG	100
66-22RJA. DNA	51	TTGAATATGT	TTATAGTAGA	GTGTGGCAGA	CTCTTATGTA	CTAGTTTGTG	100
68-43DJA. DNA	51	ATGACAGTTG	TA-TA-TTCA	AGACATAAAG	ATGGTA---G	GTGTTTGTGT	100
68-44DJA. DNA	51	GTATAGTIT	GTTCCTGTG	TTAG-TG-AA	TGTA-GTTC	AACAAGAGGA	100
		110	120	130	140	150	
23-36DRO. DNA	101	-ATAG--ACA	-TGGAT-TAG	TAAGTGAATA	TAGATTAT-T	CTGTTAT-AG	150
25-12DRO. DNA	101	-TTTGTGACA	GTGGAT-TAT	AGAATGTATG	TTATGTAT-T	ATGTTATTGA	150
27-26DRO. DNA	101	GATTTGTAGT	GA-GTTATGA	TACATGATTT	TGAT--AGAT	-AACT-ACGT	150
27-27DRO. DNA	101	TAGTATAGAG	TTGAAT-TAC	TATGT---TT	TAGTTTGT-T	ATGTT-TGAA	150
30-24DRO. DNA	101	TG--GTAGAT	TGT-GT-GAG	TTGATGTATG	AAGAGTATAT	ATGTTAT-AG	150
59-17DJA. DNA	101	TAGTATGAGT	TAGAATGCCA	GATAGAAAIT	TTGTTTAGAT	-TGTTTATGT	150
66-22RJA. DNA	101	TGCAGTGTGT	TGTAGT-ATA	GTGTAAATTT	TGGCGTGTAT	ATACTTT-GA	150
68-43DJA. DNA	101	TTAGTGAATGT	TATAGTTTGT	CGTGTAAAGT	TTGT--AAGT	-TG---GTGT	150
68-44DJA. DNA	101	-GGT-TAGTG	AAGAGT-TAG	TTAGTAAAGT	---AATGA-T	GTGTTATTA	150
		160	170	180	190	200	
23-36DRO. DNA	151	TTTGTTTTGT	TGC-TACTGT	TATACTGT-T	CAITCAAITT	AGAGGT-ATG	200
25-12DRO. DNA	151	TTTGTGTTAT	TATATAATGC	TATA--AAT-	CGTT-GGTAT	GGTGGT-GTA	200
27-26DRO. DNA	151	TAAATGTTAT	AATGGTATAG	GTGGGTGATA	GGATACATGG	TAGGTTTGTG	200
27-27DRO. DNA	151	TGTATGTATA	TAGTTTGTAT	GGTAAGAITA	TGGTGGGTT	GTGGAT-TGG	200
30-24DRO. DNA	151	TTTATGTTTA	TAAAGTGTGT	GGTTGTGAT	TACTGTGATG	TGTGGT-GTG	200
59-17DJA. DNA	151	TACCTAATGT	T-TGTATCTT	AAGGTTGA-A	TGGTA---TG	TATGTTGATA	200
66-22RJA. DNA	151	TCTATGTT--	--ATATAT-T	ATTTGTTAAT	TATGAT--TG	TATAG--GTA	200
68-43DJA. DNA	151	TAAACTGTAT	TATATTGTTT	ATTTGGTGT-G	TGTTA---GT	TGGGTTGGTG	200
68-44DJA. DNA	151	TGTTGATAAG	TATATAAGT	T-TA-TAAA-	TGTTCC-TAT	AACTGT-GTG	200
		210	220	230	240	250	
23-36DRO. DNA	201	ATAAGGTAGT	ATAGGTTTAT	TTTTGGTACG	CTTATGATCC	TGAAAATGCA	250
25-12DRO. DNA	201	AGGTAGTGGT	TTAGGTT-GC	TTGAGTAGAA	AATAGGGTTA	GAAAAATCC	250
27-26DRO. DNA	201	GTAGGTTGCT	TC--CGTT--	TGTTATAGGT	TGAGG--TTA	TAAATTTGTG	250
27-27DRO. DNA	201	TAAAGGTGAG	ATTGTTGGGC	TGACAG-ATA	TTTGAAGGTT	TAAATTTCGT	250
30-24DRO. DNA	201	GTAG-TATTT	GTTTTGTTAT	TGGTGG--AT	TTTTGGTACTA	AAAATTTCTG	250
59-17DJA. DNA	201	GTGTGCTGGT	TTGGAGTA--	TGTTGGTAAAG	TTAAGGGTTA	AAAATTT-CG	250
66-22RJA. DNA	201	GTGGATGCTT	GTAA-GTGA-	-GGTGG--AA	AT-GGTGTGT	AAAATTTTGA	250
68-43DJA. DNA	201	CTATGTTTGT	GTGGTAT---	TGCTGTAAT	TGTGGTATTA	AAAATTT-CG	250
68-44DJA. DNA	201	GATGGGTTGT	ATAGGTTT--	TGATGGTTAA	AATGAGGTGC	GGAAAATTTCC	250
		260	270	280	290	300	
23-36DRO. DNA	251	GAAAACCTCG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGGCCG	CAAIT.....	300
25-12DRO. DNA	251	GGAAACTCTG	ATTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGACCC	AAAAT.....	300
27-26DRO. DNA	251	GAAAGTTAGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAC	TTTTGGGTCC	GAAT.....	300
27-27DRO. DNA	251	GATTTCTTGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAGA	TTTTGGGGCCG	CAAAA.....	300
30-24DRO. DNA	251	GGAAITTTGG	TTTTGGGAGG	GGTTTTCAGA	TTTTGGGGCCG	AAAAT.....	300
59-17DJA. DNA	251	-GAAGCTTGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAC	TTTTGGGTCCG	GATTT.....	300
66-22RJA. DNA	251	GAAAACCTGTG	TTTTAGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGGCCG	AAAAT.....	300
68-43DJA. DNA	251	AGAAAACCTGG	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAC	TTTTGGGGCC	GGAAT.....	300
68-44DJA. DNA	251	AGAAAACCTGA	TTTTGGGAGG	GGCGTTCAAA	TTTTGGGGCCG	CAAAAT.....	300

continuación figura 33

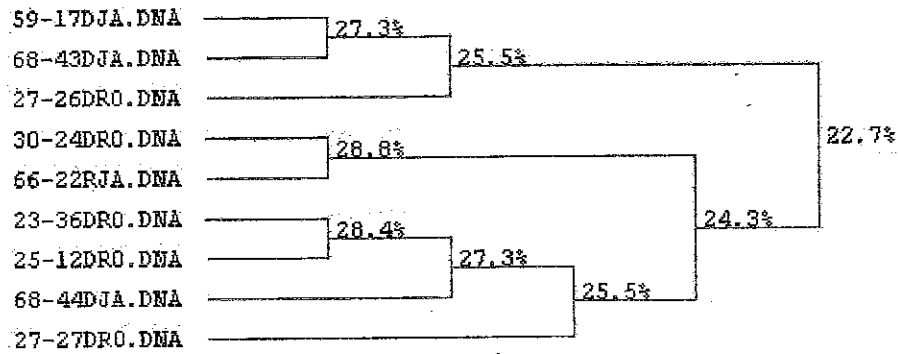
Jalapa-Santa Rosa

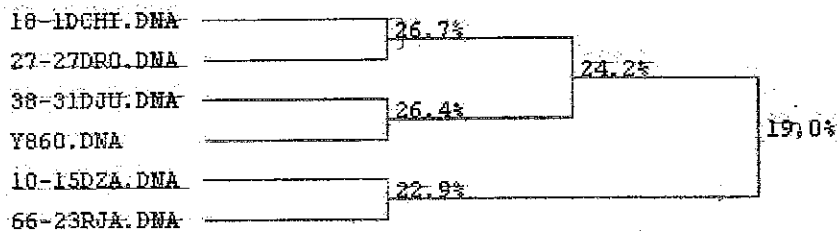
Figura 34
 Alineación de secuencias, por el método de Higgins-Sharpe, de las regiones hipervariables del minicírculo de un clon de cada departamento con la secuencia de la cepa Y de Brazil, así como su diagrama de similitud.

Las secuencias se muestran en orientación 5'-3'.

		10	20	30	40	50	
10-15DZA.DNA	1	AATATAAC--	--ATAATGGT	TAGTGAATGG	TAGACTTGTA	TGTGTATTAG	50
18-1DCHI.DNA	1	AATATAGGG	TTGTACTTGG	ATTGGAATTA	ATGCITGGA	TTTAGTAITG	50
27-27DRO.DNA	1	AAC-TATAAG	CTGGA-TGGT	AATG---TTA	CTTTTGTGTA	GITAGAAITG	50
38-31DJU.DNA	1	AATATAACCA	GTGTGT--GG	CITAGGGTTG	--GGCT--TG	CITATAGATG	50
66-23RJA.DNA	1	AATATAGA--	--GCG-TGGA	TTATGA-TGG	TGAGATAATG	TTGATAT-AG	50
Y860.DNA	1	AGGGATTATG	GTGGGT--AT	GATAGAAT--	--GG-T--AG	AATATAGTTA	50
		60	70	80	90	100	
10-15DZA.DNA	51	ATTGAT-ATA	GTTAGATACG	ATAAATGGTT	TGTTAATGTA	AGTAGAT--A	100
18-1DCHI.DNA	51	---TGTTATG	AAGTGTAAAG	TATGT-A-TG	ATTAGATAGT	GTGCT-GTGA	100
27-27DRO.DNA	51	GTCTAGTGA	GATTATGACA	TGTGTTA-TG	TACAAGCTTT	GAATTCGTGA	100
38-31DJU.DNA	51	TTAATTGTATG	-TTTGTTCGG	TCTGG-A-TG	TGTTATTCCT	AGTTATGTAG	100
66-23RJA.DNA	51	TTTGATTATT	TGTTAATTATA	GTTTTAATTT	TATTGAAGTT	-GTAGCTTAG	100
Y860.DNA	51	GT-TGATATG	-ATTATAATA	TGIG----TA	CAGAAGCTGT	ATGAATGTAG	100
		110	120	130	140	150	
10-15DZA.DNA	101	ATGTACTTTG	TATTGTGTAT	A-GAGAT-GT	GTAAGTTACT	GTATTAATGT	150
18-1DCHI.DNA	101	AAGAATAGTG	AAGAGAGTGA	GTAGAGTTTC	TTTGTTTATG	TTAGTAG-AT	150
27-27DRO.DNA	101	TAGGATAGTA	TAGAGTTGAA	TTACTATGTT	TTAGTTTGT	ATGTTTGA-AA	150
38-31DJU.DNA	101	TTATGTAGTT	CATTATTCAT	TCACCACAT-	--AGT--ATT	ATA-TAA-AT	150
66-23RJA.DNA	101	ACATATAACA	GAGAACAAT	G-GTAGTAGT	GAAGATAGAT	TTTGTGA-GT	150
Y860.DNA	101	TGGAGTTACT	TAATGAAAGT	GTATC---T-	--GAA--GTT	-TG-TGA-AT	150
		160	170	180	190	200	
10-15DZA.DNA	151	TATCTAGGAG	GGGTA-GTTG	-GATAGGAGG	GGTAGTTGGA	TAGGAGGGGT	200
18-1DCHI.DNA	151	CAT-TGT-TA	TACTTT-TAG	TTATAATATA	ATATGAGGG-	-GTTAAAGGT	200
27-27DRO.DNA	151	TGTATGTATA	TAGTTT-GTA	TGGTAAGATT	ATGGGTGGGT	TGTGGATTGG	200
38-31DJU.DNA	151	TATATTCATA	AT-TTCTTA	TAATGTTATG	TTATATAGTT	TGTTGTTTAT	200
66-23RJA.DNA	151	TGTATAAAGA	TAGTATGTTA	TAGTTTATTC	ATTATTAAGA	TACTAGTGG-	200
Y860.DNA	151	TGTATTATTA	AAGTTTGTTA	TAATGTGTTG	A-ATAAAGGT	-GTTGTG-GT	200
		210	220	230	240	250	
10-15DZA.DNA	201	---ACCTGGG	TGAATTACGG	ATAAGCTGT-	-TAATGTTG-	GCCGGAATA	250
18-1DCHI.DNA	201	TTAAGGTGGG	--TGTG---	----TGGA-	-TACTTATGG	GTTATAAATT	250
27-27DRO.DNA	201	TTAAGGTGAG	ATTGTTG--G	GCTGACAGA-	-TATTTGAAG	GTT-TAAATT	250
38-31DJU.DNA	201	TATATATGAT	ATCGGTA-CG	TCTTGTACGG	GTAAGAGTGG	GTTGCAATA	250
66-23RJA.DNA	201	---AGATAAG	TG--TTGCAT	GTTAG--GT-	-TAATGTTGA	GGTTGAAATT	250
Y860.DNA	201	GGCATGTGGG	TTTGTGTCG	ACCAGTGGAT	ACATTA-TGA	GGTGGGAAA-	250
		260	270	280	290	300	
10-15DZA.DNA	251	ATTTGGATAA	-CTATGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTT	GGGCTCGGA	300
18-1DCHI.DNA	251	TTTCGGGAAA	GTCTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCGGAAT	300
27-27DRO.DNA	251	--TCGTGATT	TCTTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAGATTTG	GGGCCGAAA	300
38-31DJU.DNA	251	TTGCGGAAAT	-T-TGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCGGAAA	300
66-23RJA.DNA	251	GCTTTGG-GT	-TTGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGGCCAAA	300
Y860.DNA	251	TTTCGAAAAT	GT-TGGTTTT	GGGAGGGGCG	TTCAAATTTG	GGGCCGAAA	300
		310	320	330	340	350	
10-15DZA.DNA	301	-----	-T.....	350
18-1DCHI.DNA	301	T-----	-----	350
27-27DRO.DNA	301	A-----	-----	350
38-31DJU.DNA	301	A-----	-----	350
66-23RJA.DNA	301	-----	-T.....	350
Y860.DNA	301	ATCATGCATC	TC.....	350

continuación figura 34

YBrazil-Chiquimula-Sta. Rosa-Jutiapa-Jalapa-Zacapa



Nota: la secuencia analizada de la cepa Y Brazil es una secuencia parcial, ya que comprende de la región de 860 pb hasta 1130 pb. Y860 = es el nombre designado en éste análisis para determinar la cepa Y Brazil.

Cuadro 10

Análisis de porcentaje de similitud de la región hipervariable del minicírculo de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) de la cepa Y Brazil con la de los clones secuenciados

No.	Aislado-clon-especie-depto	Match %	Sobre (pb)
1	10-12DZA	58.1	279
2	23-32DRO	58.6	280
3	25-12DRO	59.1	281
4	13-15RZA	56.7	289
5	38-32DJU	58.3	283
6	68-43DJA	60.5	271
7	38-31DJU	58.2	251
8	68-44DJA	62.2	275
9	12-10RZA	56.6	279
10	50-2DJUT	59.6	270
11	66-22RJA	61.4	272
12	18-1DCHI	60.8	268
13	18-4DCHI	59.7	293
14	27-27DRO	59.9	287
15	23-36DRO	56.3	279
16	36-33DCH	60.9	281
17	30-25DRO	59.8	276
18	27-26DRO	62.1	282
19	14-7DZA	62.7	292
20	66-23RJA	57.4	272
21	30-24DRO	58.1	284
22	4-5DJUT	58.4	286
23	36-35DCH	59.8	261
24	59-11DJA	60.7	272
25	72-2DJUT	57.3	281

continuación cuadro 10

No.	Aislado-clon-especie-depto	Match %	Sobre (pb)
26	59-17DJA	59.5	289
27	12-11RZA	57.8	287
28	12-1RZA	58.8	284
29	13-10RZA	57.4	282
30	4-6DJUT	57.4	284
31	14-3DZA	56.3	286
32	10-15DZA	52.0	273
33	72-3DJUT	60.1	288
34	50-3DJUT	55.8	285

Nota: D = *T. dimidiata*, R = *Rhodnius prolixus*, Chi = Chiquimula, Ro = Sta. Rosa, Za = zacapa, Ja = Jalapa, Ju = Jutiapa.

Además, las secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo de *T. cruzi* fueron comparadas con un fragmento de secuencia de 49 pb de la región variable del minicírculo (No. acceso en GenBank™ U43566) (*vid* figura 35). Este fragmento de 49 pb, según Ochs, *et al.*, 1996 puede servir como templado para la transcripción de un ARN guía para editar el ARN del segmento de la subunidad 6 de la ATPasa en los maxicírculos de *T. cruzi*. Este segmento de secuencia fue obtenido de la región variable del minicírculo de *T. cruzi*. No obstante, se concluyó que ninguna de las secuencias amplificadas de la región hipervariable del minicírculo de *T. cruzi* presenta similitud alguna con éste fragmento de 49 pb en cualquiera de las orientaciones del fragmento (5'-3' o 3'-5'). Este análisis se realizó utilizando los parámetros preestablecidos en el "software" de DNAsis para encontrar similitudes por el método de Lipman-Pearson.

Figura 35

Fragmento de secuencia de 49 pb de la región variable del minicírculo que puede servir como templado para ARN guía de la subunidad 6 de la ATPasa en *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Ochs, *et al.*, 1996)

10 20 30 40
 3' uuagaagauu guggaugaga uaaauagaga cacagcauaa gaguagaca 5' ARN guía

Otro análisis hecho a las secuencias de las regiones hipervariables del minicírculo de *T. cruzi*, fue la traducción de la secuencia de un clon, escogido al azar. Esta secuencia se analizó en las orientaciones 5'-3' y viceversa para encontrar cuadros abiertos de lectura, por el método de Fickett, con el fin de identificar regiones que pueden codificar alguna proteína (veáse figuras 36, 37, 38, 39, y 40; y cuadros 11, 12, 13, y 14).

Figura 36
Traducción de la región variable del minicírculo de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)
del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' y 5'-3'

3'

10	20	30	40	50	60
UUAACCCGGG	ACUUUCAACU	UGC GGGGAGG	GUUUUAGUUU	UAAAGACUUA	AAAAUUGGAG
70	80	90	100	110	120
AUGUUUAAUG	GAAUAGAUGG	UUUGUGUUUU	GUUAAGUUUG	GAUGUCAUUG	GCAAAUAGA
130	140	150	160	170	180
UCGGUUGUGU	AAUAUUGUUAU	AAGAAUGAGU	UGUUGUUUAU	UUUCUUAUAG	UUUGAUUGAU
190	200	210	220	230	240
AGUGUAUGGG	GGUAGAUAGC	AUAAGUUAGU	ACAUGCGUUA	GUUUAGUUUAU	AUGGGUUAGU
250	260	270	280	290	300
UAUUGAUAGG	UUUUAAUUGU	AGUGGACGUG	UUGGGGAUUAU	AA	5'

5'

10	20	30	40	50	60
AAUAUAGGGG	UUGUGCAGGU	GAUGUUAUUU	UUGGAUAGUU	AUUGAUUGGG	UAUAUUGAUU
70	80	90	100	110	120
UGAUUGCGUA	CAUGAUUGAA	UACGAUAGAU	GGGGGU AUGU	GAUAGUUAGU	UUGAUUUUCU
130	140	150	160	170	180
UUUAUUUGUU	GUUGAGUAAG	AAUAUGUUUAU	AAUGUGUUGG	CUAGAUAAAA	CGGUUACUGU
190	200	210	220	230	240
AGGUUUGAAU	UGUUUUGUGU	UUGGUAGAUU	AGGUAAUUUG	UAGAGGUAAA	AAAUUCAGAA
250	260	270	280	290	300
AUUUUGAUUU	UGGGAGGGGC	GUUCAACUUU	CAGGGCCCAA	UU	3'

Cuadro 11
Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia
traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5'
utilizando el código genético universal

Cuadro de lectura	empieza (pb)	Termina (pb)	Masa Molecular Daltons
1	1	49	1830.11
	5	130	2918.31
	61	130	2658.01
	145	193	1811.02
2	2	2	18.02
	68	74	278.32
	77	140	2316.79
3	3	66	2185.29
	117	102	548.67
	207	186	707.76
	213	219	305.39
	231	237	206.26

Figura 37
Diagramas de los cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia
traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5'
utilizando el código genético universal

Cuadro de lectura 1

NIGVVQVMLILDSY*LGILI*LRT*LNTIDGGM**LV*YSFICC*VRICYNVLAR*NG
YCRFELFCVW*IR*FVEVKNSEILILGGAFNFQGP

Cuadro de lectura 2

I*GLCR*C*FWIVIDWVY*FDCVHD*IR*MGVCDS*FDILLFVVE*EYVIMCWLDK
TVTIVGLNCFVFG*GNL*R*KIQKF*FWEGRSTFRAQ

Cuadro de lectura 3

YRGCAGDVNFG*LLIGYIDLIAYMIEYDRWGYVIVSLIFFYLLL SKNML*CVG*IK
RLL*V*IVLCLVDKVICRGKKFRNFDGFRGVQLSGPN

Nota: las abreviaciones de los aminoácidos están descritas en la sección de anexos. el * denota codón de terminación.

Cuadro 12
Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia
traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3'
utilizando el código genético universal

Cuadro de lectura	empieza (pb)	Termina (pb)	Masa Molecular Daltons
1	1	43	1563.80
	22	43	853.98
	97	100	149.21
2	2	5	131.17
	89	107	610.68
	152	209	2189.55
3	3	36	1158.21
	72	150	3227.74
	144	150	262.36

Figura 38
Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia
traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3'
utilizando el código genético universal

Cuadro de lectura 1

NIGVVQVMLILDSY*-----*-*-----M**-*-----*-----*-----*-*-----

Cuadro de lectura 2

I*-----*-*-----*-----*-*MGVCDS*-----*-----MCWLDKTVTVGLNCFVFGR*-----*--

Cuadro de lectura 3

YRGCAGDVNFG*-----MIEYDRWGYVIVSLIFFYLLLSKNML*-----*-----*-*-----

Nota: las abreviaciones de los aminoácidos están descritas en la sección de anexos. el * denota codón de terminación. Las regiones marcadas denotan cuadros de lectura posibles que sugieren una codificación para alguna proteína o algún ARN guía.

Cuadro 13
Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos

Cuadro de lectura	empieza (pb)	Termina (pb)	Masa Molecular Daltons
1	1	49	1830.11
	55	130	2918.31
	61	130	2658.01
	145	193	1811.02
2	2	2	18.02
	68	74	278.32
	77	140	2316.79
3	3	66	2185.29
	102	117	548.67
	186	207	707.76
	213	219	305.39
	231	237	206.26

Figura 39
Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 3'-5' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos

Cuadro de lectura 1

LTRDFQLAGRVLVLKT*-MEMFNGIDGLCFVKFGCHWQNRSVV*----
MSCCLFSYSLIDSVWG*-*-----*-----*

Cuadro de lectura 2

------*-----ME*MVCVLLSLDVIGKIDRLCNIV*-----*-----*
--*_*-----

Cuadro de lectura 3

NPGLSTCGEGFSFKDLKNGDV*-----*--MSLAK*-----*---*--MGVDSIS*--
MR*---MG*-----

Nota: las abreviaciones de los aminoácidos están descritas en la sección de anexos. el * denota codón de terminación. Las regiones marcadas denotan cuadros abiertos de lectura posibles que sugieren una codificación para alguna proteína o algún ARN guía.

Cuadro 14

Cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos

Cuadro de lectura	empieza (pb)	Termina (pb)	Masa Molecular Daltons
1	2	5	131.17
	89	107	610.68
	152	209	2189.55
2	3	36	1158.21
	72	150	3227.74
	144	150	262.36
3	4	103	3876.45
	22	103	3280.73
	97	103	335.41

Figura 40

Diagramas de cuadros abiertos de lectura encontrados para la secuencia traducida del clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' utilizando el código genético mitocondrial de protozoos

Cuadro de lectura 1

I*-----*-----*MGVCDS*-----*---MCWLDKTVTIVGLNCFVFR*---*
*-----

Cuadro de lectura 2

YRGCAGDVNFG*-----MIEYDRWGYVIVSLIFFYLLSKNML*---*---*-----

Cuadro de lectura 3

IGVVQVMLILDSYWLGLIWLRTWLNTIDGGMW*-----*-----*---*

Nota: las abreviaciones de los aminoácidos están descritas en la sección de anexos. el * denota codón de terminación. Las regiones marcadas denotan cuadros de lectura posibles que sugieren una codificación para alguna proteína o algún ARN guía.

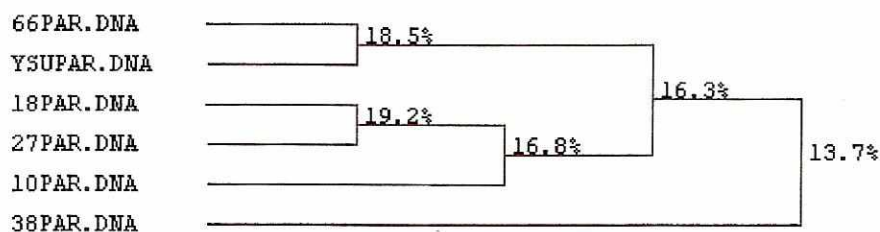
La posibilidad de varios cuadros abiertos de lectura en la región de 70-220pb del clon 3 del aislado 14, orientación 5'-3'; sugirió el análisis de alineación de secuencias de esa región, por el método de Higgins-Sharpe, entre un clon de cada departamento y la cepa Y-Brazil (*vid* figura 41).

Figura 41

Alineación de la región entre 70-220 pb de las regiones hipervariables del minicírculo entre un clon de cada departamento con la secuencia de la cepa Y de Brazil, así como su diagrama de similitud, por el método de Higgins-Sharpe.

Las secuencias se muestran en orientación 5'-3'.

	10	20	30	40	50
10PAR. DNA	1 ---ATGGTTT	GTTAATGTAA	GTA-GATAAT	GTACTTTGTA	TTGTGTATAG
18PAR. DNA	1 TGTATGATTA	GATAGTGTGC	T-GTGAAAGA	ATAGTGAAGA	GAGTGAAGTAG
27PAR. DNA	1 T-TATGTACA	AGCTTTGAAT	TCGTGATAGG	ATAGTATAGA	GTTGAATTAC
38PAR. DNA	1 --TGTGTT--	ATCTTAGTT	ATGTAGTTAT	GTAGTTCATT	ATTCATTAC
66PAR. DNA	1 ATTGTATTGA	AGT--TGTA-	GCTTAGACAT	ATAAC--AGA	GAACAAATGG
YSUPAR. DNA	1 ACTGTGATGA	A----TGTA-	GTGGAGTTAC	TTAATG-AAA	GTGTATCTGA
	60	70	80	90	100
10PAR. DNA	51 AGATGTGTAA	GTTACTGTAT	TAATGT--TA	TCTAGGAGGG	GT-AGTTG-G
18PAR. DNA	51 AGTTTCTTTG	TTTATGTTAG	TAGATC-AT-	TGT-TATACT	TTTAGTTATA
27PAR. DNA	51 TATGTTTTAG	TTTGTATGT	TTGAAT-GTA	TGTATATAGT	TTGTATGGTA
38PAR. DNA	51 CAC-----	ATAGTATTAT	ATAAATTATA	TTCATAAATT	TCTTATAATG
66PAR. DNA	51 TAGTAGTGAA	GATAGATTTT	GTGAGTTGTA	TAAAGATAGT	ATG--TTATA
YSUPAR. DNA	51 AGTTTGTGAA	T-TGTATTAT	TAAAGTT-TG	TTATAATTGT	TTGAATAAAG
	110	120	130	140	150
10PAR. DNA	101 ATAGGAGGGG	TAGTTGGATA	GGAGGGGTAG	CTGGG--TGA	ATTACGG-AT
18PAR. DNA	101 ATATAAATATG	AGGG--GTTA	AAGGTTAAG	GTGGG--TG-	-TTGTGG-AT
27PAR. DNA	101 AGATTATGGG	TGGGTTGTGG	ATTGTTAAG	GTGAG--A-	-TTGTTG-G-
38PAR. DNA	101 TTATGTTATA	TAGTTTGTGG	TTTATTATAT	ATGATATCGG	TACGCTTGT
66PAR. DNA	101 GTTTATTTCAT	TAT-TAAGAT	ACTAGTGGAG	ATAAG--TGT	TGCATGTTAG
YSUPAR. DNA	101 GTGTTGTGGT	GGCATGTGGG	TTTGTGTGCG	ACCAG--TGG	-ATACATTAT
	160	170	180	190	200
10PAR. DNA	151 AAGCTGTAA	TG.....
18PAR. DNA	151 ACTTATGGGT	TA.....
27PAR. DNA	151 GCTGACAGAT	--.....
38PAR. DNA	151 ACGGGTAAGA	GT.....
66PAR. DNA	151 GTTAATGTTG	A.....
YSUPAR. DNA	151 GAGGGTGGAA	AT.....



Nota: la denotación par significa que es una parte de la secuencia de esos clones. La numeración que aparece descrita en la alineación de secuencias corresponde al No. de aislado. Las muestras analizadas fueron las siguientes y están dadas por No. aislado-No. clon-departamento: 10-15Za, 18-1Chi, 27-27Sta. Rosa, 38-31Ju, 66-23Ja.

Analizando todos los resultados en conjunto, sobre la variabilidad génica entre las regiones hipervariables secuenciadas, se identificó que las secuencias de los clones analizados, junto con la secuencia de la cepa Y Brasil presentan dos regiones casi conservadas:

- **Extremo 5'. Aprox. 10 pb (posible relación con origen de replicación):** Al inicio del extremo 5' de las secuencias se identificó una región casi conservada de aproximadamente 10 pb, lo cual sugiere que podría estar relacionada con la secuencia universal del minicírculo, UMS. Esta secuencia universal es un dodecámero compuesto de la siguiente forma: $\overline{\text{GGGGTTGGTGTA}}$ (Gharaibeh, *et al.*, 2000). La región marcada constituye parte del iniciador S36 utilizado en este estudio para amplificar la región hipervariable del minicírculo. Por lo que se propone que esos 10 nucleótidos podrían ayudar a estabilizar el origen de replicación.
- **Extremo 3'. Aprox. 25 pb (posible relación con replicación del minicírculo o con la transcripción de gARN para la edición de transcritos mitocondriales):** En el extremo 3' de las secuencias analizadas se identificó una región casi conservada de aproximadamente 25 pb. Esto sugiere dos hipótesis:
 - i) que el extremo 3' podría estar relacionado con la replicación del minicírculo: unión con la topoisomerasa II, para catalizar la concatenación.
 - ii) Que el extremo 3' esté relacionado con la transcripción de ARN guía para la edición de transcritos mitocondriales; es decir, que edite la parte final o inicial del ARNm proveniente del maxicírculo para la transcripción del ARN guía, que podría continuar en la región conservada.

Por medio del algoritmo de Higgins-Sharpe, se encontró que la similitud entre las secuencias de los clones junto con la cepa Y Brazil es de 20-35% aproximadamente; mientras que el algoritmo de Lipman-Pearson indica que existe aproximadamente 60% de similitud. Esta diferencia de similitud se debe a que el algoritmo de Lipman-Pearson no es tan estricto como el de Higgins-Sharpe, ya que no incluye penalizaciones por espacio sino que establece un parámetro de corte mínimo de similitud. No obstante, estos resultados sugieren que la región hipervariable del minicírculo del kinetoplasto es altamente variable entre clones de un mismo aislado de *T. cruzi*, entre aislados de un mismo departamento, y entre aislados de distintos departamentos.

Como complemento al análisis sobre las regiones hipervariables del minicírculo de *T. cruzi*, se tradujo el clon 3 del aislado 14 en orientación 5'-3' y viceversa para identificar posibles cuadros abiertos de lectura, utilizando el código genético universal y el código genético mitocondrial de protozoos. Con base en este análisis, se encontró que hay varios posibles cuadros abiertos de lectura en las regiones hipervariables comprendidas entre los 70pb – 220pb, sugiriendo que esta región podría ser transcrita para codificar alguna proteína o algún ARN guía, para editar ARN mensajeros del maxicírculo.

Con el programa de alineaciones “BLAST” del Centro Nacional de Información de Biotecnología “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), se compararon los clones secuenciados con secuencias de protozoos publicadas en GenBank. Entre los resultados obtenidos, no se encontró alineación alguna relacionada con ARN guías, sino que sólo con secuencias reportadas de muestras clínicas de corazón chagásico. Por otra parte, se alinearon, con el método de Lipman-Pearson, los clones secuenciados con secuencias de ARN guías de *T. cruzi* provenientes de la base de datos de Goringe (<http://biosun.bio.tu-damstadt.de/goringe/gRNA/gRNA.htm>), y se encontró que algunos clones tienen una similitud de hasta el 70% aproximadamente, con las secuencias de ARNg publicadas (datos no mostrados). Sin embargo, se sugiere un estudio más profundo sobre la función de las secuencias de los clones.

Por último, con el marcador molecular de la región hipervariable del minicírculo no se pudo sugerir agrupación alguna de los aislados de *T. cruzi* entre los departamentos de Zacapa, Santa Rosa, Chiquimula, y Jutiapa.

VI. CONCLUSIONES

1. La región conservada del ADN cinetoplasto del minicírculo se mantiene entre distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*, ya que se logró amplificar, clonar y secuenciar la región hipervariable, utilizando iniciadores que se encuentran en la región conservada del minicírculo.
2. Los resultados de RFLP con la enzima RsaI sugieren que los aislados de *Trypanosoma cruzi* son altamente variables para dicho sitio de restricción.
3. La búsqueda de los sitios de restricción para las enzimas RsaI, TaqI, AluI, Sau3AI, HinfI, y HaeIII en las secuencias sugiere también una alta variabilidad entre aislados.
4. El análisis de alineación múltiple de secuencias sugiere una similitud entre el 20% y 35%.
5. El análisis de la cepa Y Brasil con los clones secuenciados sugiere que hay 60% similitud.
6. La presencia de varios posibles cuadros de lectura abiertos para la región hipervariable del minicírculo utilizando el código genético universal y el código genético mitocondrial de protozoos sugiere que la región variable puede ser transcrita.
7. Los resultados obtenidos con RFLP y con el análisis de secuencias sugieren que no hay recombinación dentro y entre los minicírculos de *Trypanosoma cruzi* apoyando entonces, la teoría sobre la estructura clonal del parásito.

8. La región variable del ADN cinetoplaso del minicírculo no es un buen marcador para determinar la variabilidad de los aislados de *Trypanosoma cruzi*.

VII. RECOMENDACIONES

Una de las limitaciones de este estudio fue que no se clonaron los aislados de *Trypanosoma cruzi*, por lo que no se pudo hacer una diferenciación entre cepas. Para futuros trabajos de investigación sobre *Trypanosoma cruzi* se recomienda clonarlos, sea por dilución seriada o por microscopía, dado que aumentaría el poder robusto obtenido en dichos estudios.

En cuanto a la determinación de variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*, se podría realizar un estudio complementario de análisis de frecuencias alélicas del parásito, mediante el uso de microsátélites como marcadores moleculares. La ventaja de este estudio sería determinar el flujo de cepas de *Trypanosoma cruzi* y posible correlación con los vectores de donde fueron extraídos. La población de estudio podría comprender no sólo los departamentos endémicos, analizados en este estudio, sino que también los departamentos de Alta y Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Quiché, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Petén, San Marcos e Izabal. La razón de incluir estos departamentos es que también presentan seropositividad, aunque no está bien documentado. Al mismo tiempo, sería interesante extender la población de estudio a lo largo de Latinoamérica. El análisis de secuencias microsátélites se podría realizar con la tecnología fluorescente "GeneScan", ya que los resultados obtenidos con este análisis son bastante precisos. Además, la técnica puede ser automatizada en un secuenciador de capilaridad, obteniendo resultados en pocos días.

Por otro lado, con las regiones hipervariables del minicírculo del cinetoplasto de aislados de *Trypanosoma cruzi* secuenciadas se podrían realizar sondas marcadas con fluorescencia, para detectar por hibridización *in situ* tejidos chagásicos y, posiblemente, encontrar una correlación clínica.

Para determinar los linajes de las cepas de *Trypanosoma cruzi* que están circulando en Guatemala se podrían utilizar dos marcadores moleculares: el miniexon y secuencias de ARN ribosomal, tal como se describe en un estudio realizado en aislados de *Trypanosoma cruzi* de Brazil propuesto por Fernandez, *et al.* (1998). Este estudio se podría correlacionar con el de flujo genético del parásito utilizando microsatélites como marcador molecular, descrito anteriormente.

Por último, paralelamente se está haciendo un análisis de flujo genético de los vectores donde fueron extraídos dichos aislados, utilizando también como marcador molecular microsatélites, se podría hacer una correlación entre dicho estudio, entre el estudio de linajes por miniexon, y el estudio de flujo genético de *Trypanosoma cruzi* por microsatélites, para determinar si hay alguna relación entre los vectores de cada departamento con los grupos de *Trypanosoma cruzi* presentes en el área endémica, con el objetivo final de analizar el control de transmisión de la Enfermedad de Chagas en Guatemala.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Altschul, S. F. 1997. "Sequence comparison and alignment". In DNA and protein sequence analysis: a practical approach. by (M. Bishop and J. Rawlings, eds.). USA. IRL Press. 137-165.
2. Alves, A., D. F. Almeida and W. Von Kruger. 1994. "Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles induced by environmental conditions DNA subcloning". Journal of Eukaryotic Microbiology. 41 (4): 415-419.
3. Andrade, S. 1989. Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice. USA. 509-514.
4. 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.
5. Avila, H., A. Goncalves, N. Nehme, C. Morel and L. Simpson. 1990. "Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable regions sequences". Molecular and Biochemical Parasitology. 42: 175-188.
6. Barnabe, C., S. Brisse and M. Tibayrenc. 2000. "Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas Disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach". Parasitology. 120: 513-526.
7. Barry, J., Beaty and C. William. 1996. the Biology of Disease Vectors. USA. Marquardt University Press of Colorado. 631 pp.
8. Benne, R. 1992. "RNA editing in trypanosomes. The us(e) of guide RNAs". Molecular and Biology Rep. 16: 217-227.
9. Black, N. and N. Du Teau. 1997. "RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetics studies". In Molecular Biology of Insect Disease Vectors and Methods Manual. by (J. Crampton, C. Beard and L. By, eds.). USA. Chapman and Hall. 45-48.

10. Bosseno, M. F., J. Telleria, F. Vargas, N. Yacsik, F. Noireau, A. Morin and S. F. Breniere. 1996. "Trypanosoma cruzi: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian Triatoma Infestans vectors shows a high frequency of mixed infections". *Experimental Parasitology*. 83: 275-282.
11. Breniere, S. F., M. F. Bosseno, J. Telleria, B. Bastrenta, N. Yacsik, F. Noireau, J. L. Alcazar, C. Barnabé, P. Wincker and M. Tibayrenc. 1998. "Different Behavior of two Trypanosoma cruzi major clones: transmisión and circulation in young bolivian patients". *Experimental Parasitology*. 89: 285-295.
12. Brown, T.A. 1998. *Gene Cloning: an introduction*. 3 ed. USA. Stanley Thorns Ltd. 334 pp.
13. Caramello, P. 2001 *Blood, bone, Marrow Spleen and Heart and Muscles Parasites*. (Last revised: Enero2002), last update: 2001, <http://www.cdfound.to.it/HTML/tc4.htm>.
14. Carrasco, J. 1996. Amplificación por PCR del ADN satélite de Trypanosoma cruzi. aplicación al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Universidad de Granada. Guatemala. Departamento de Biología. 1-30.
15. CDC. 2001, 2002. *Chagas Disease Image Library*. (Last revised: Enero 2001, Octubre 2002 respectivamente), last update: Enero 2001, Octubre 2002 respectivamente. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm.
16. Cordon, C. 2002. Encuesta entomológica de la dispersión de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. No publicado
17. Dorn, P. 2001 *Population genetics of Chagas Disease vectors in Guatemala*. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://www.logno.edu/~dorn/pop.genetics.htm>.
18. Englund, P., D. Guilbride, K. Hwa, C. Johnson, C. Li, L. Rocco and A. Torri. 1996. "Kinetoplast DNA: structure and replication". In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. by (D. Smith and M. Parsons, eds.). UK. Oxford University Press. 75-87.
19. Felsenstein, J. 2002 *Phylogeny Programs*. (Last revised: Septiembre 2002), University of Washington. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.etc1.html>

20. Fernandes, O., R. Souto, J. Castro, B. Pereira, N. Carrara, A. Junqueira, R. Naiff, T. Barret, W. Degrave, B. Zingales, D. Campbell and J. Coura. 1998. "Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences.". The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 58 (6): 807-811.
21. GCG. Testcode+. (Last revised: Septiembre 2002), GCG package software. http://pdb.igh.cnrs.fr/GCGdoc/Program_Manual/Pattern_Recognition/testcode.html.
22. Gharaibeh, R., M. GarciaEspitia and E. Orozco. 2000. "Presence of sequence homologous to the universal minicircle sequence (UMS) of trypanosomatids in the DNA circles of *Entamoeba histolytica*". Archives of Medical Research. 31: S296-S298.
23. Goble, C. 1992. "Tratamiento de la Enfermedad de Chagas": 439-442.
24. Goldsmith, R. 1978. Epidemiologic studies of Chagas Disease in Oaxaca Mexico. In World Health Organisation. 236-250.
25. Guevara, A., J. Eras, M. Recalde, L. Vinueza, P. Cooper, A. Ouaisi and R. Guderain. 1997. "Severe digestive pathology associated with chronic Chagas Disease in Ecuador: report of two cases.". Sociedad Brasileira de Medicina Tropical. 30 (5): 389-392.
26. Guevara, A. and A. Ouaisi. 2001 *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease). (Last revised: Octubre 2001), last update: 2001, <http://www.cdfound.to.it/html>.
27. Guhl, F., C. Jaramillo, G. Vallejo, F. Cárdenas, A. Arroyo and A. Aufderheide. 2000. "Chagas Disease and human migration". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 95 (4): 553-555.
28. Gupta, H. 2000 October 4th Lecture Notes. (Last revised: Septiembre 2002), last update: Octubre 2000, Memphis University. <http://www.msci.memphis.edu/~giri/compbio/f00/HGupta/MSA2.htm>.
29. Hadjuk, S. and R. Sabatini. 1996. "RNA editing: postranscriptional restructuring of genetic information". In Molecular Biology of Parasitic Protozoa. by (D. Smith and M. Parsons, eds.). UK. Oxford University Press. 135-149.

30. Hanahan, D. and C. S. H. Laboratory. 1983. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Journal of Molecular Biology*. 166: 557-580.
31. Hartl, D. and A. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd. edition. Canada. Sinauer Associates, Inc Publishers. 368-369.
32. Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M., Reynolds, A., Silver, L., Veres, R. 2000. *Genetics: from Genes to Genomes*. USA. McGrawHill. 820 pp.
33. Hillis, D., C. Moritz and B. Sunderland. 1996. *Molecular systematics*. USA. Sinauer Associates. 655 pp.
34. Hitachi. 1994. DNAsis software for Windows version 2.6. Hitachi Software Engineering Co. Ltd and Molecular Biology Insights, Inc.
35. Hurtarte, S., K. Yamaguchi, S. Hisafumi, A. Escobar, M. Shimada, T. Yoshimura, H. Ogata and I. Tada. 1993. "Situación epidemiológica de las enfermedades cardíacas en Guatemala". In Informe Anual No. 3 (GJET-35) de Enfermedades Tropicales en Guatemala. by (Y. Tabaru, ed.). Guatemala. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).
36. INGEBI. 2001 *Molecular biology of Chagas Disease laboratory*. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://Therion.dna.uba.ar/labchagas/espaniol.htm>.
37. Invitrogen. 2000. *Electroporator II Manual*. Invitrogen. 13-20.
38. Klinbeil, M. D., M., Liu, Y., Morris, J., Motyka, S., Saxowsky, T., Wang, Z., Englund, P. 2001. "Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication". *Protist*. 152: 255-262.
39. Laurent, J., C. Barnabé, V. Quesney, S. Noel and M. Tibayrenc. 1997. "Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*". *Parasitology*. 114: 213-218.
40. Lewin, B. 2000. *Genes VII*. New York, USA. Oxford University Press. pp. 990.
41. Lipman, D. and W. Pearson. 1985. "Rapid sensitive protein similarity searches". *Science*. 227: 1435-1440.

42. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. 1995. *Molecular Cell Biology*. 3 ed. USA. Scientific American Books. 1343 pp.
43. Macedo, A., R. Oliveira and S. Peña. 2002. "Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis". *Expert Reviews in Molecular Medicine*: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>. 1-19.
44. Macedo, A. and S. Peña. 1998. "Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease". *Parasitology Today*. 14: 119-124.
45. MacVector. MacVector user guide 7.0. (Last revised: Septiembre 2002), http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bioinfo_326/MacVector/codingregionund.pdf.
46. McDaniel, J. and J. Dvorak. 1993. "Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants". *Molecular and Biochemical Parasitology*. 57: 213-222.
47. Miles, M., A. Souza, M. Povoá, J. Shaw, R. Lainson and P. Toyé. 1978. "Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in amazonian Brazil". *Nature*. 272: 819-821.
48. Monroy, C., M. Mejía, A. Rodas and Y. Tabaru. 1993. "Ecología intradomiciliar de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*". In Informe Anual No. 3 (GJET-35) de Enfermedades Tropicales en Guatemala. by (Y. Tabaru, ed.). Guatemala. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).
49. Monroy, C., M. Mejía, A. Rodas and Y. Tabaru. 1995. "Transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas". In Informe anual No. 3 (GJET-35) de Enfermedades Tropicales en Guatemala. by (Y. Tabaru, ed.). 1994. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).
50. Monteiro, F., A. Escalante and C. B. Beard. 2001. "Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective". *Trends in Parasitology*. 17 (7): 344-347.
51. Montenegro, L. 1943. Consideraciones sobre la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas en Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. 74 pp.

52. Morris, J. D., M.; Klinbeil, M.; Motyka, S.; Saxowsky, T.; Wang, Z.; Englund, P. 2001. "Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium". Elsevier. *International Journal for Parasitology*. 31: 453-458.
53. Ochs, D. E. O., K.; Teixeira, S.; Moser, D. R.; Kirchhoff, L. V. 1996. "Maxicircle genomic organization and editing of an ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*". *Molecular and Biochemical Parasitology*. 76: 267-278.
54. Oliveira, R., N. Broude, A. Macedo, C. Cantor, C. Smith and S. Peña. 1998. "Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites". *Proc. Natl. Acad. Scie*. 95: 3776-3780.
55. OPS. 1992. Oficina Sanitaria Panamericana. In Oficina Regional de la Salud Organización Panamericana de la Salud, material visual.
56. PCS and C. M. University. 2000 Clustal-multiple sequence alignments documentation. (Last revised: Septiembre 2002), last update: Enero 2000, Pittsburgh Supercomputing Center (PCS), Carnegie Mellon University. http://www.psc.edu/general/software/packages/culstal/manual/user_manual.html.
57. Pennington, P. 2001. Cultivos de *T. cruzi*. Comunicación personal.
58. Petana, W. 1979. Educational approach in the control of Chagas disease. USA. Editorial University. 499 pp.
59. Pietrzak, S. M., E.; Torri, A.; Hajduk, S. 1987. "Transcription of kinetoplast DNA minicircles". *Cell*. 49: 625-632.
60. Ryckman, R. 1986. "Names of the triatominae of North and Central America and the West Indies: their histories, derivations and etymology (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)". *Bulletin Social Vector and Ecology*. 11 (2): 209-220.
61. Sanchez, G., A. Wallace, S. Muñoz, J. Venegas, S. Ortiz and A. Solari. 1993. "Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by several molecular markers supports a clonal mode of reproduction". *Biological Research*. 26: 167-176.
62. Schofield, C. 1994. *Triatominae: biología y control*. United Kingdom. Eurocommunica Publications. 71 pp.

63. Souto, R., O. Fernandes, A. Macedo, D. Campbell and B. Singales. 1996. "DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*". *Molecular and Biochemical Parasitology*. 83: 141-152.
64. Sturm, N., W. Degraeve, C. Morel and L. Simpson. 1989. "Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnostics of Chagas.". *Molecular and Biochemical Parasitology*. 33: 205-214.
65. Tibayrenc, M., K. Neubauer, C. Barnabe, F. Guerrini, D. Skarecky and F. Ayala. 1993. "Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis". *Proc. National Academy of Science*. 90: 1335-1339.
66. Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya and F. Ayala. 1986. "Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of chagas disease, have a complex multiclonal structure". *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 83: 115-119.
67. UCLA. 2002. Mitochondrial DNA of *Leishmania* and *Trypanosomes*. (Last revised, Septiembre 2002), <http://www.hhmi.ucla.edu/c168/week5/lecture2.htm>.
68. Venegas, J., S. Ortiz, S. Muñoz and A. Solari. 1997. "Molecular karyotype DNA schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from chilean triatomines". *Parasitology*. 115: 41-46.
69. Vilee, C. 1996. *Biología*. 8 ed. México, D.F. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. 944 pp.
70. Wagner, W. and M. So. 1992. "Identification of a novel large extrachromosomal DNA (LED) in the trypanosomatidae". *Molecular Microbiology*. 6: 2299-2308.
71. WHO. 1991. *Control of Chagas Disease*. Panama.
72. WHO and TDR. 1989 Image # 9105071. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://www.who.int/tdr/index.html>.
73. WHO and TDR. 1990 Image # 9105025. (Last revised: Enero 2002), last update: Enero 2002, <http://www.int/tdr/index.html>.
74. WHO and TDR. 1991 Image # 9105057. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://www.who.int/tdr/index.html>.

75. WHO, TDR and Stammers. 2000 Image # 0005365. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://www.who.int/tdr/index.html>.
76. WHO, TDR and Stammers. 2000 Image # 0005361. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001, <http://www.who.int/tdr/index.html>.
77. WHO, TDR and Wellcome. 1991 Image # 9105002. (Last revised: Enero 2002), last update: Enero 2002, <http://www.int/tdr/index.html>.
78. Zeledon, R. 1981. El *Triatoma dimidiata* y su relación con la Enfermedad de Chagas. Costa Rica. Inciensa y Editorial EUNED. 142 pp.

IX. APÉNDICES

A. Glosario

Ácido desoxirribonucleico (ADN). Es la molécula de herencia que contiene información genética codificada en orden específico de sus nucleótidos constituyentes. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Ácido ribonucleico (ARN). Ácido nucleico que contiene un azúcar ribosa; se encuentra en el núcleo y citoplasma, y tiene importancia primordial en la síntesis de proteínas. (Hartwell, *et al.*, 2000)

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

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

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

Aislado. Es un conjunto de cepas de *Trypanosoma cruzi* obtenido de un individuo; en este caso de un triatomo.

Alelo. Cualquiera de un grupo de formas alternantes de un gen que pueden encontrarse en un punto dado (*locus*) sobre un cromosoma. (Villem, 1996)

Aminoácido. Moléculas que sirven para construir proteínas (Hartwell, *et al.*, 2000). Compuesto orgánico que posee un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH); los aminoácidos pueden unirse para formar cadenas de péptidos en la molécula de proteína. (Villem, 1996)

ARN guía (gRNA). Templado de ARN que sirve como guía para editar transcritos de mRNA por medio de la adición o deleción de uridinas. (Hartwell, *et al.*, 2000)

ARN mensajero (mRNA). Tipo peculiar de ácido ribonucleico que es sintetizado en el núcleo y pasa a los ribosomas del citoplasma; se combina con ARN en los ribosomas y brinda una plantilla para la síntesis de una enzima o de alguna otra proteína específica. (Villem, 1996)

Canibalismo. Cuando una chinche chupa sangre directamente de una chinche recién alimentada. (Schofield, 1994)

Cebador. Cadena corta, preexistente de polinucleótidos a la cual puede ser agregada ADN nuevo por medio de la acción de la ADN polimerasa. (Hartwell, *et al.*, 2000)

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

Competente. Se refiere al cultivo de bacterias que ha sido tratado para aumentar su habilidad de adquirir nuevas moléculas de ADN (Brown, 1998). **Células electrocompetentes** se refiere al cultivo de bacteria tratadas con cambios de temperatura para modificar la pared celular de las bacterias de modo que aumenten su habilidad de adquirir nuevas moléculas de ADN.

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

Clon de *Trypanosoma cruzi* o clon. Parásito de *Trypanosoma cruzi* que posee propiedades biológicas y tropismo específico por un tejido humano. Estas propiedades y tropismos pueden variar entre cada parásito. Los clones se dividen por fisión binaria, y son estables. Evolucionan sólo por mutaciones, y la recombinación ocurre raramente.

Clon recombinante. Población de células idénticas, generalmente aquellas que contienen moléculas recombinantes de ADN idénticas (Brown, 1998).

Cloneta. Cepas que parecen como idénticas para un grupo dado de marcadores genéticos en una especie clonal. (Laurent, *et al.*, 1997)

Codominancia. Expresión de fenotipo heterocigoto teniendo como resultado un descendiente que se asemeja a ambos padres. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Codón. Serie de tres nucleótidos adyacentes que codifican un aminoácido. (Villegas, 1999)

Coprofagia. Cuando la chinche ingiere deyecciones infectadas de otra chinche. (Schofield, 1994)

Cuadros abiertos de lectura (ORF). Secuencias de aminoácidos identificadas como genes que codifican para proteínas cuyas funciones aun no han sido descritas. Los ORF se caracterizan por largos fragmentos de codones en el mismo cuadro de lectura y que no están interrumpidos por codones de terminación. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Delección. Cuando un bloque de uno o más pares de nucleótidos se pierden en una molécula de ADN. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Diploide. Que tiene número doble de cromosomas que un gameto; que posee dos series de cromosomas. (Villegas, 1999)

Electroforesis. Método de separación de moléculas (como fragmentos de ADN o proteínas) de una mezcla similar de moléculas. Corriente eléctrica es aplicada a un medio que contiene la mezcla y cada una de las moléculas viaja a través del medio a velocidad distinta, dependiendo del tamaño, y de su carga eléctrica. La separación se basa en estas diferencias.

Electroporador. Aparato que sirve para electroporar células electrocompetentes.

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

Enzimas de restricción o endonucleasas de restricción. Proteínas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas y cortas y cortan el ADN en esos sitios. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Eppendorf. Tubo pequeño de polipropileno donde se colocan pequeños volúmenes de alguna solución y guardarla o utilizarla para hacer alguna reacción. La capacidad volumétrica de éstos tubos varía desde 200 μ L hasta 1.7 mL.

Erlenmeyer. Frasco de vidrio resistente a altas temperatura (de hasta 130 lb de presión) en forma de cono.

Enlace peptídico. Enlace covalente que une aminoácidos durante la síntesis de proteínas. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Esquizodemo. Nombre propuesto para el patrón de restricción característico de una cepa (Macedo, *et al.*, 1998)

Fragmento de okazaki. Hebra de ADN sintetizada discontinuamente como fragmentos pequeños de 1000 bases. (Hartwell, *et al.*, 2000)

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

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

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

Haploide. Que tiene una sola serie de cromosomas, como se observa normalmente en un gameto maduro. (Villem, 1999)

Hebra templado “template strand”. Una hebra de ARN que sirve como patrón para el mRNA y es complementario al ARN codificado por el ADN y al mRNA. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Locus (loci en plural). Punto peculiar en el cromosoma. (Hartwell, *et al.*, 2000)

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

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

Microsatélite. Secuencia de ADN repetitiva (uno a seis nucleótidos) uno tras otro “tandem repeats”. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Minicírculo. ADN circular, uno de los componentes del ADN cinetoplasto, que codifica ARN guías que editan los transcritos de los maxicírculos para formar cuadros abiertos de lectura. (Sturm, *et al.*, 1989)

Mutación. Alteración permanente y transmisible en la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, usualmente en un sólo gen que conlleva a un cambio o pérdida de su función normal. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Nifurtimox. Nombre comercial Lampit (Bayer). (Goble, 1992)

“Northern blot”. Técnica de hibridación para detectar la presencia de mRNA en una mezcla de macromoléculas. Los mRNA son detectados con ADN complementario. (Lodish, *et al.*, 1995)

Nucleótido. Subunidad de ADN o ARN que consiste de una base nitrogenada (en ADN adenina, guanina, citocina, timina; y en ARN adenina, guanina, uridinas o citocinas), una molécula de fosfato, y una molécula de azúcar. Miles de nucleótidos son unidos para formar moléculas de ADN o ARN. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Óligo. Cadenas cortas de ADN que sirven como plantilla para iniciar la síntesis de una nueva hebra de ADN. (Hartwell, *et al.*, 2000)

par de bases (bp). Dos bases nitrogenadas unidas por enlaces débiles. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Péptidos. Polímero pequeño que usualmente contiene 30 o menos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. (Lodish, et al., 1995)

Plaques. Dispersión de bacterias sobre todo el medio sólido de crecimiento, en condiciones estériles.

Polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP). Variación en el tamaño de fragmento de ADN, entre individuos, obtenidos por cortar con enzimas de restricción. El RFLP es causado por mutaciones en el sitio de corte de las enzimas. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Proteína. Grandes polímeros compuestos de cientos a miles de subunidades de aminoácidos unidos entre sí en un orden específico.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un método rápido para replicar segmentos de ADN en una mezcla compleja utilizando cebadores como punto de inicio. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Secuenciación. Determinación del orden de nucleótidos en una molécula de ADN o ARN o el orden de aminoácidos en una proteína. (Hartwell, *et al.*, 2000)

Secuenciador automático. Aparato que determina automáticamente una secuencia de nucleótidos marcados por medio de la utilización de electroforesis capilar y detección fluorescente o detección quimioluminiscente.

Sitios de restricción. Secuencia corta y específica compuesta de cuatro a ocho nucleótidos reconocida por enzimas de restricción. (Hartwell, *et al.*, 2000)

“Southern blot”. Técnica de hibridación para detectar secuencias de ADN específicas. (Lodish, et al., 1995)

spp. Término científico que denota varias especies.

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

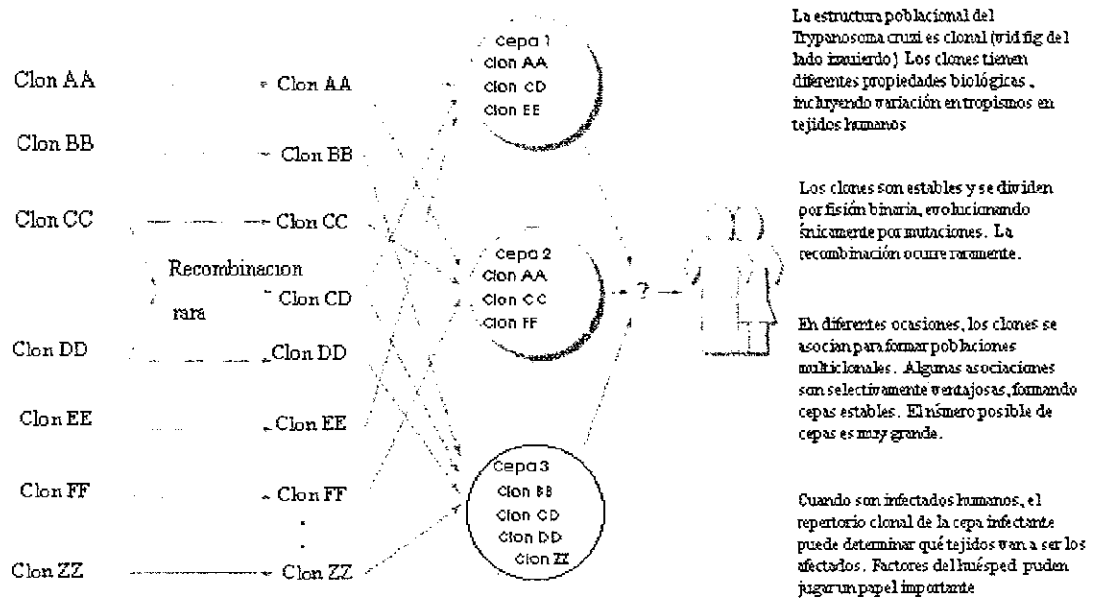
Transmisión transovárica. Transmisión desde la madre hasta la cría. (Schofield, 1994)

Uridinas “uracil” (U). Base nitrogenada que se encuentra normalmente en el ARN pero no el ADN; la uridina es capaz de formar pares de base con adenina. (Hartwell, et al., 2000)

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

B. Estructura clonal de *Trypanosoma cruzi*

Figura 42
Modelo Histotrópico clonal de la Enfermedad de Chagas
(Macedo, y Peña, 1998)



C. Estimación de la masa molecular de bandas desconocidas obtenidas por RFLP

1. Curvas de calibración con marcador molecular 25pb: \log_{10} masa molecular (pb) comparado con la distancia recorrida (cm).

2. Ecuación obtenida:

$$Y = mX + b$$

Donde, $Y = \log_{10}$ masa molecular (pb)

$X =$ distancia recorrida (cm)

$m =$ pendiente

$b =$ intercepto en el eje Y

3. Con la distancia recorrida de la banda desconocida, A, se encontró "Y". Al resultado se le hizo lo siguiente:

$$Y = \log \text{ masa molecular A (pb)}$$

$$10^Y = 10^{\log \text{ masa molecular A (pb)}}$$

$$10^Y = \text{ masa molecular A (pb)}$$

4. Lo mismo se hizo para la curva de calibración con marcador molecular (100 + 25)pb.
5. Se reportó la media de la masa molecular de la banda desconocida, A, calculada por ambas curvas de calibración.

D. Factor de corrección, F, para la masa molecular de las bandas desconocidas

1. Definición del factor de corrección

$$F = (\text{masa molecular de control interno teórico}) - (\text{masa molecular del control interno experimental})$$

Donde, F = factor de corrección (pb)

masa molecular del control interno teórico = 143 pb

masa molecular del control interno experimental = calculado con las curvas de calibración a partir de los fragmentos obtenidos por RFLP's (pb)

2. Corrección de masa molecular de bandas obtenidos por RFLP's

$$(\text{Masa molecular de bandas obtenidas}) + (\text{Factor de corrección}) = \text{Banda corregida}$$

E. Identificación de posibles esquizodemos

La identificación de posibles esquizodemos se basó en la razón de masas moleculares y en los patrones de restricción observados. Si la razón era parecida y coincidía con el patrón de restricción observado en las geles se asumía un posible esquizodemo.

$$\text{Razón de masas moleculares} = \frac{\text{Masa molecular corregida de banda en estudio (pb)}}{\text{Masa molecular del control interno (pb)}}$$

Donde, la masa molecular del control interno era siempre constante, 143 pb.

- F. Distancias migradas de los estándares moleculares de 25 pb y de (100 + 25) pb utilizados para el análisis de esquizodemos de los distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*.

Cuadro 15
Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega)
en las geles corridas para los aislados 4-25 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	# Aislado							
	4	10	12	13	14	18	23	25
300	3.21	2.45	3.50	2.55	3.20	2.40	3.15	2.55
275	3.41	2.55	3.70	2.70	3.40	2.60	3.30	2.70
250	3.61	2.75	3.90	2.90	3.55	2.75	3.50	2.85
225	3.81	2.95	4.15	3.10	3.75	2.95	3.75	3.05
200	4.05	3.15	4.35	3.30	4.10	3.15	4.00	3.25
175	4.37	3.35	4.60	3.50	4.40	3.40	4.25	3.45
150	4.72	3.6	4.90	3.75	4.70	3.65	4.55	3.70
125	5.05	3.9	5.30	4.10	5.10	3.95	4.90	4.05
100	5.52	4.3	5.75	4.50	5.60	4.35		4.40

MM* = masa molecular en pb

Cuadro 16
Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega)
en las geles corridas para los aislados 27-68 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	# Aislado							
	27	30	36	38	50	59	66	68
300	2.50	3.20	3.40	2.95	3.50	3.45	2.70	2.60
275	2.70	3.30	3.50	3.05	3.65	3.65	2.85	2.70
250	2.85	3.60	3.70	3.20	3.95	3.85	3.05	2.95
225	3.05	3.85	3.95	3.40	4.15	4.10	3.25	3.10
200	3.30	4.10	4.20	3.60	4.35	4.35	3.45	3.35
175	3.55	4.40	4.45	3.80	4.70	4.60	3.66	3.55
150	3.80	4.70	4.70	4.10	5.00	4.85	3.95	3.80
125	4.20	5.10	5.05	4.40	5.40	5.30	4.30	4.15
100	4.60		5.55	4.90	5.80	5.75	4.65	4.55

MM* = masa molecular en pb

Cuadro 17
Distancias migradas del estándar molecular de 25 pb (Promega)
en la gel corrida para el aislado 72 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	72 (cm \pm 0.05)
300	2.50
275	2.65
250	2.80
225	3.00
200	3.15
175	3.35
150	3.65
125	3.95
100	

Cuadro 18
Distancias migradas del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega)
en las gels corridas para los aislados 4-25 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	# Aislado							
	4	10	12	13	14	18	23	25
300	3.22	2.45	3.50	2.55	3.20	2.35	3.10	2.55
275	3.40	2.60	3.70	2.75	3.35	2.55	3.25	2.70
250	3.61	2.75	3.90	2.95	3.50	2.70	3.45	2.85
225	3.81	2.95	4.10	3.10	3.75	2.90	3.65	3.00
200	4.05	3.15	4.35	3.35	4.05	3.10	3.95	3.20
175	4.35	3.35	4.60	3.55	4.35	3.35	4.20	3.45
150	4.72	3.65	4.90	3.80	4.65	3.60	4.50	3.65
125	5.05	3.95	5.25	4.10	5.05	3.90	4.85	4.00
100	5.50	4.35	5.75	4.50	5.55	4.30		4.35

MM* = masa molecular en pb

Cuadro 19
Distancias migradas del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega)
en las geles corridas para los aislados 27-68 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	# Aislado							
	27	30	36	38	50	59	66	68
300	2.50	3.20	3.40	2.90	3.50	3.40	2.70	2.55
275	2.65	3.30	3.50	3.00	3.70	3.60	2.85	2.70
250	2.80	3.55	3.70	3.15	3.95	3.80	3.00	2.90
225	3.00	3.80	3.90	3.30	4.15	4.05	3.20	3.10
200	3.25	4.05	4.15	3.55	4.35	4.30	3.45	3.30
175	3.50	4.35	4.40	3.80	4.70	4.55	3.65	3.50
150	3.75	4.60	4.70	4.10	4.95	4.80	3.95	3.75
125	4.15	5.05	5.05	4.40	5.30	5.25	4.25	4.10
100	4.55		5.60	4.85	5.80	5.70	4.60	4.50

MM* = masa molecular en pb

Cuadro 20
Distancias migrada del estándar molecular de (100 + 25) pb (Promega)
en la gel corrida para el aislado 72 de *T.cruzi* (cm \pm 0.05)

MM*	72 (cm \pm 0.05)
300	2.50
275	2.65
250	2.80
225	3.00
200	3.15
175	3.35
150	3.65
125	3.95

- G. Ejemplo de análisis de la migración en $\text{cm} \pm 0.05 \text{ cm}$ de los estándares internos de 25pb y 100pb + 25 pb.

Cuadro 21

Migración de los marcadores de masa molecular de la electroforesis corrida en una misma gel para los clones del aislado 4

MM*	estándar de 25 pb	estándar (100 + 25) pb	Desviación Estandar
300	2.60	2.55	0.04
275	2.70	2.70	0.00
250	2.95	2.90	0.04
225	3.10	3.10	0.00
200	3.35	3.30	0.04
175	3.55	3.50	0.04
150	3.80	3.75	0.04
125	4.15	4.10	0.04
100	4.55	4.50	0.04

MM* = Masa molecular

- H. Migración media en $\text{cm} \pm 0.05$ de los marcadores de masa molecular de 25pb y 100pb + 25pb tomando en cuenta todas las geles de acrilamida analizadas.

Cuadro 22
Migración media de los marcadores de masa molecular
de 25pb y (100 + 25)pb en 17 geles

MM*	25 bp		100pb + 25 pb	
	Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estándar
300	2.93	0.41	2.92	0.42
275	3.08	0.42	3.07	0.42
250	3.28	0.44	3.26	0.44
225	3.49	0.46	3.46	0.46
200	3.72	0.48	3.69	0.48
175	3.96	0.51	3.94	0.51
150	4.24	0.53	4.22	0.52
125	4.60	0.56	4.57	0.54
100	5.02	0.60	4.99	0.61

MM* = Masa molecular

I. Abreviaturas de aminoácidos

Cuadro 23
Abreviaturas de aminoácidos utilizando el código de una letra

Aminoácidos	código
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutámico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lysina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V
cualquier aminoácido	Z