

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



EXPLORACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE
SEIS POBLACIONES DE CEPAS SALVAJES DE
***Trypanosoma cruzi* TcI AISLADAS EN BOLIVIA POR**
SECUENCIACIÓN MULTILOCUS 2014-2015

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Licenciatura

POR: MARCELO ROMAN JURADO CASTRO

ASESORES: DR. CHRISTIAN BARNABE

DRA. SIMONE FRÉDÉRIQUE BRENIERE

LA PAZ – BOLIVIA

Noviembre, 2015

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA

Tesis de Grado:

EXPLORACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE SEIS POBLACIONES DE
CEPAS SALVAJES DE *Trypanosoma cruzi* TcI AISLADAS EN BOLIVIA POR
SECUENCIACIÓN MULTILOCUS 2014-2015

POR: MARCELO ROMAN JURADO CASTRO

Para optar el grado académico de *Licenciado en Bioquímica*

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido:.....

Director de carrera: Dr. M.Sc. Bernardo Torrico Arzady

Tutores: M. Sc. Christian Barnabe, Ph. D. Simone Frédérique Breniere

Tribunal: M. Sc. Pablo Irahola Schmeisser

Tribunal: M. Sc. Nelly Lilian Rosio Buitrago Romero

Tribunal: Dra. Wilma Strauss Zegada

Dedicatoria

A Dios, mis padres y hermanos que me apoyaron mucho.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecer a JESUS mi DIOS por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño.

A la UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES, por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mis asesores de tesis Doctor Christian Barnabe y a la Doctora Simone Frédérique Breniere por su paciencia, dedicación y criterio. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda dentro del complejo mundo de la genética.

A la Doctora Wilma Strauss, por su buena voluntad y disponibilidad en los ambientes del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

A la Doctora Susana Revollo por el apoyo y aliento a lo largo de mi etapa universitaria.

A la Agencia de Cooperación Francesa - Institut de Recherche pour le Développement por el apoyo efectuado para la realización de la presente Tesis.

A todas las personas que han formado parte de mi vida universitaria, por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en todos los momentos de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Finalmente, todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo y el cariño que me inspiraron mis padres, que de forma incondicional, entendieron y soportaron mis ausencias y mis malos momentos. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi agradecimiento.

Para ustedes: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo general	5
1.4.2. Objetivos específicos	5
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Generalidades	6
2.1.1. Histórico de la enfermedad	6
2.1.2. Distribución geográfica y la prevalencia de infección humana por <i>T. cruzi</i>	7
2.2. El agente patógeno	8
2.2.1. Taxonomía.....	8
2.2.2. Estadios evolutivos.....	9
2.2.3. Ciclo biológico del parásito	10
2.3. El vector	12
2.4. Reservorios.....	14
2.5. Modos de transmisión de la enfermedad.....	15
2.5.1. Transmisión a través de vectores	15
2.5.2. Transfusión sanguínea.....	16
2.5.3. Transmisión congénita	16
2.5.1. Otros	17
2.6. Patología.....	17
2.6.1. Fase aguda.....	18
2.6.2. Fase crónica.....	18
2.7. Diagnóstico y control de la enfermedad de Chagas	19
2.7.1. Diagnóstico de laboratorio por método directo.....	19
2.7.2. Diagnóstico de laboratorio por método molecular	20
2.7.3. Diagnóstico de laboratorio por métodos indirectos	20

2.8. Tratamiento	22
2.9. Prevención y control	22
2.10. Estructura genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
2.10.1. Variabilidad genética	24
2.10.2. Evolución de <i>T. cruzi</i> modelo clonal	26
2.10.3. Modelos para el origen de las DTUs híbridas	28
2.10.4. Diversidad genética dentro de las DTUs	30
2.10.5. Patogénesis de la enfermedad de Chagas y las DTU	32
2.10.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.1. Origen geográfico de las poblaciones	36
3.2. Preparación del ADN	36
3.3. Amplificación por PCR de los fragmentos de los genes seleccionados.....	43
3.4. Análisis y correcciones de las secuencias e identificación de los haplotipos	45
3.5. Estudio de la diversidad genética de las cepas bolivianas.....	47
3.6. Análisis de panmixia dentro las poblaciones en estudio	47
3.7. Análisis de la estructuración genética entre las poblaciones.....	49
3.8. Estudios filogenéticos con los genes mitocondriales	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Alineamiento de las secuencias para cada gen	52
4.2. Incertidumbres en los genes nucleares	54
4.2.1. Heterocigotos en el gen nuclear GPI.....	56
4.2.2. Heterocigotos en el gen nuclear GPX	56
4.2.3. Heterocigotos en el gen nuclear LAP.....	57
4.2.4. Heterocigotos en el gen nuclear PDH	57
4.2.5. Heterocigotos en el gen nuclear GTP.....	57
4.3. Incertidumbres en los genes mitocondriales	58
4.4. Diversidad genética de las secuencias de las seis poblaciones para los 4 genes nucleares y los 2 genes mitocondriales.	59
4.5. Análisis de diversidad genética	60
4.6. Análisis de desequilibrio de Hardy-Weinberg	62

4.7. Análisis de desequilibrio de ligamiento	64
4.8. Distancia genética entre poblaciones	64
4.9. Análisis AMOVA de la estructuración entre las poblaciones.....	65
4.10. Construcción de un árbol inter-poblaciones.....	66
4.11. Análisis filogenético de árboles y redes para los genes mitocondriales.....	67
4.11.1. Gen mitocondrial COII.....	67
4.11.2. Gen mitocondrial CYTB	72
5. DISCUSIÓN	76
5.1. Diversidad Genética	77
5.2. Recombinación dentro la especie <i>T. cruzi</i>	78
5.3. Estructuración de las poblaciones de <i>T. cruzi</i> en Bolivia.....	82
5.4. Análisis filogenéticos	83
6. CONCLUSIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA	87

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas (Morel & Lazdins, 2003).	7
Figura 2. Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> a) Amastigotes en una célula de un tejido de musculo cardiaco b) Epimastigotes dentro el intestino medio de un triatomino. c) Trypomastigotes en la sangre (Dr J.-F. Pays)	10
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 4. Distribución geográfica de los principales vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> (WHO, 2002).	13
Figura 5. Ilustración del modo de transmisión vectorial por contaminación con deyecciones infectadas de los insectos vectores.	16
Figura 6. Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre (Zingales, Miles et al. 2012) o domiciliario.	26
Figura 7. Distribución geográfica de las DTU's de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el Continente Americano. Tomado de Patterson y Guhl, 2010.....	32
Figura 8. . Mapa de Bolivia: localización y distancias entre las 6 poblaciones de <i>T. cruzi</i> analizadas (Barnabe et al. 2013)	37
Figura 9. Amplificación de los fragmentos de ADN (PCR), se observa en los pozos 1-2 amplificados del gen <i>CYTB</i> , pozos 3-4 amplificados del gen <i>COII</i> , pozos 5-6 amplificados del gen nuclear <i>GPI</i> , el ultimo pozo corresponde al marcador molecular de 100 pb.....	53
Figura 10. Lectura de la secuencia de ADN (cromatograma), correspondiente a los genes <i>GPX</i> (Y,R), <i>LAP</i> (K,M,S) y <i>COII</i> (W), se observan dobles picos (incertidumbres entre dos nucleótidos) que según el Sistema de notación internacional IUPAC corresponden a: (Y) = C o T, (R) = A o G, (K) = G o T, (M) = A o C, (S) = G o C, (W) = A o T.	53
Figura 11. Relaciones genéticas entre poblaciones de <i>T. cruzi</i> , árbol construido a escala con el método neighbor-joining (NJ) usando los Fst como distancias genéticas.....	67

Figura 12. Árbol filogenético construido con el método de máximo de verosimilitud para el gen mitocondrial *COII*. El mejor modelo de substitución fue Tamura 3-parameter.....70

Figura 13. A) Red evolutiva (Median Joining network) de las diferentes DTUs estudiadas con el gen *COII*. Los puntos negros representan secuencias hipotéticas creadas por el programa, cada número rojo indica 1 mutación entre uno y otro haplotipo. Se observaron 5 árboles muy similares formando la red. B) Distribución de las 6 poblaciones nacionales respecto a cepas de referencia de *T. cruzi* I.....71

Figura 14. Árbol filogenético construido con el método de máximo de verosimilitud para el gen mitocondrial *CYTB*. El mejor modelo de substitución fue Tamura 3-parameter.....74

Figura 15. A) Red evolutiva (Median Joining network) de las diferentes DTUs estudiadas con el gen *CYTB*. Los puntos negros representan secuencias hipotéticas creadas por el programa, cada número rojo indica 1 mutación entre uno y otro haplotipo. Se observaron 4 árboles muy similares formando la red. B) Distribución de 4 poblaciones nacionales respecto a cepas de referencia de *T. cruzi* I.....75

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Origen geográfico, huéspedes, DTU, ciclo y distribución en 6 poblaciones de las 116 cepas de <i>T. cruzi</i> utilizadas en el estudio.....	38
Tabla 2. Secuencias de cebadores, tamaño de fragmentos y localización	43
Tabla 3. Código de cepas de referencia en GenBank® de <i>T. cruzi</i> perteneciendo a las DTUs TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y como out group <i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i> , utilizadas en la construcción del árbol y la red filogenética	46
Tabla 4. Incertidumbres en los genes nucleares.....	54
Tabla 5. Incertidumbres en los genes mitocondriales	58
Tabla 6. Índices de variabilidad de seis genes para cepas TcI silvestres	60
Tabla 7. Principales índices de diversidad genética, análisis de <i>Fis</i> y <i>valor-P</i> por locus (horizontal) y por población (vertical) de las poblaciones de <i>T. cruzi</i> TcI aisladas de seis poblaciones estudiadas	62
Tabla 8. <i>Valor-P</i> de significación de los <i>Fst</i> obtenidos entre poblaciones	65
Tabla 9. Resultados del análisis molecular de la varianza (Abramova, Burakova et al. 1979) para poblaciones de <i>T. cruzi</i> a diferentes agrupamientos	66
Tabla 10. Distribución de las cepas en función de los haplotipos y las DTUs para el gen mitocondrial <i>COII</i>	68
Tabla 11. Distribución de las cepas de <i>T. cruzi</i> en función de los haplotipos de diferentes DTUs para el gen mitocondrial <i>CYTB</i>	73

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es una especie muy polimórfica que posee una gran diversidad fenotípica y genética. Se subdivide en seis unidades discretas de tipificación (DTU) nombradas TcI-TcVI, de las cuales TcI es la más ubicua y variable genéticamente, se extiende en todo el continente americano, cumpliendo ciclos domésticos y silvestres. La forma de replicación clonal es la que mejor explica la estructura actual de las poblaciones, sin embargo se están describiendo muchos casos de eventos de intercambio genético entre cepas. Recientemente no se pudo descartar panmixia en poblaciones silvestres bolivianas de TcI. En este sentido, presentamos un nuevo estudio de estas poblaciones con otros marcadores genéticos (nucleares y mitocondriales) para entender mejor la diversidad y estructura genética, así también el modo de reproducción de estas poblaciones.

Se analizaron ochenta cepas silvestres bolivianas de TcI agrupadas en seis poblaciones mediante el método de “Multi Locus Sequence Typing” (MLST) con la secuenciación parcial de 5 genes nucleares y 2 genes mitocondriales. Evidenciando: (i) una notable diversidad genética en el total de las poblaciones con más de 1% de sitios variables, siendo esta variabilidad mayor en los genes mitocondriales respecto a los nucleares (ii), se observa dos tipos de propagación del parásito, donde interviene la recombinación y la replicación clonal (iii), existe una fuerte estructuración y diferenciación genética entre las poblaciones.

La principal conclusión, de nuestros resultados apoyan la existencia de alternancia entre clonalidad y sexualidad entre cepas de TcI en entornos salvajes de Bolivia, donde *T. infestans* es el vector. Sin embargo, se necesita ampliar el estudio a otras zonas para generalizar este descubrimiento en los ciclos naturales de *T. cruzi* de los valles andinos de Bolivia.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, *Enfermedad de Chagas*, *epidemiología molecular*, *genética de poblaciones*, *MLST*, *recombinación*, *clonalidad*, *marcadores genéticos*, *DTU*, *estructuración genética*.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, it is a very polymorphic species and has a high genetic and phenotypic diversity. Is subdivided into six discrete typing units (DTU) named TcI-TcVI, of which TcI is ubiquitous and genetically highly variable, it extends throughout the Americas, carry out domestic and wild cycles. Clonal replication is the best explanation of the current structure of populations of the species; however more and more “genetic exchange” events are being described between strains. Recently panmixia could be ruled out in wild populations Bolivian TcI. In this sense, we present a new study of these populations with other genetic markers (nuclear and mitochondrial) for better understanding; diversity and genetic structure and the mode of reproduction of these populations.

Were analyzed eighty Bolivian wild strains of TcI grouped into six populations by the method of "Multi Locus Sequence Typing" (MLST), with partial sequencing of five nuclear gene and two mitochondrial genes Showing: (i) a remarkable genetic diversity of total populations exceeding 1% of variable sites, this variability was high in mitochondrial genes than nuclear genes (ii), two types of parasite propagation is observed, recombination and clonal replication (iii) there is a strong genetic structure and differentiation between populations.

The main conclusion, our results support the existence of alternation between clonality and sexuality between TcI strains in wild environments of Bolivia, where *T. infestans* is the vector. However, it needs to expand the study in other areas to generalize this finding in the natural cycles of *T. cruzi* from the Andean valleys of Bolivia.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, molecular epidemiology, population genetics, MLST, recombination, clonality, genetic markers, DTU, genetic structure

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es un grave problema de salud pública en América Latina; se presenta en 21 países y afecta a unos 7 - 8 millones de personas, de las cuales 30% a 40% o bien sufren o desarrollarán cardiomiopatía, mega síndromes digestivos, o ambos, esta enfermedad genera grandes costos en términos de morbilidad, tratamiento y prevención (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>). Infecta cientos de especies hospederas de mamíferos de ocho órdenes (Artiodactyla, Carnívoros, Quirópteros, Didelphimorphia, Perisodáctilos, Primates, Roedores y Xenarthra) (Lisboa et al. 2009) y a los seres humanos sobre todo cuando los vectores migran y colonizan las viviendas (Araujo et al. 2011). El principal mecanismo de infección es la transmisión vectorial que se produce por contacto de la piel abierta o mucosas con las heces de los triatomos infectados. Otras formas de contraer la infección son la transfusión sanguínea, la vía transplacentaria o transmisión congénita, el trasplante de órganos y la transmisión oral a través de alimentos contaminados (Alarcon de Noya et al. 2010). Aunque los fármacos utilizados (benznidazol y nifurtimox) pueden ser eficaces en la fase aguda temprana, su eficacia disminuye drásticamente en la fase crónica y en la actualidad no existe una vacuna disponible.

Se trata de una infección parasitaria transmitida por insectos hematófagos denominados triatomos pertenecientes a la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae y caracterizados por tener dos tipos de ciclos, los selváticos y los domésticos (Prata 2001). A partir de la iniciativa del Cono Sur, Bolivia como País endémico para la Enfermedad de Chagas, desde 1999 en adelante está realizando el control químico del vector principal de la Enfermedad, *Triatoma infestans*, en el ambiente domiciliar y peridomiciliar de toda el área endémica. Sin embargo, ha generado preocupación a nivel del INCOSUR la descripción de focos silvestres de *T.*

infestans en Bolivia, debido a que podrían tener incidencia en el éxito de la lucha contra la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en la región. Otro motivo de preocupación son los patrones de vectores emergentes, transmisión que involucra triatomíneos silvestres mostrando tendencias sinantrópicas y entrando en contacto con los humanos (Noireau et al., 2009), ya que estos son muy propensos a abandonar su nicho ecológico en busca de comida, para conseguir pareja, en búsqueda de refugio, para escapar de depredadores o simplemente para explorar nuevos territorios. Infestando o re-infestando las viviendas humanas se convierten en un potencial riesgo para los programas de control vectorial y la salud humana en general. El conocimiento de estas poblaciones está incompleto lo que permite plantear nuevas hipótesis sobre la distribución geográfica de las poblaciones silvestres de *T. infestans*, el rol de estas poblaciones en el proceso de re-infestación doméstica y el riesgo que representan en el contexto epidemiológico de la enfermedad. Para esto es necesario una adecuada caracterización genética de las cepas de *T. cruzi* que circulan en estas poblaciones silvestres con el fin de realizar un seguimiento de la propagación de estas.

T. cruzi tiene una gran capacidad de adaptación, por lo que ha evolucionado desde hace mucho tiempo diversificando sus huéspedes y presentando múltiples estrategias frente a la heterogeneidad de las respuestas inmunes de los mamíferos. El análisis de diferentes aislamientos procedentes de humanos, insectos y reservorios, ha permitido identificar la amplia variabilidad genética del parásito, orientando hacia nuevos caminos hacia la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y pruebas diagnósticas más específicas que contribuyan a mitigar la enfermedad.

Esta diversidad genética es más elevada en medio silvestre que en medio doméstico (Lewicka et al. 1995; Lozano et al. 2008), lo cual muestra el papel crucial que juegan las poblaciones silvestres en la evolución genética del parásito. En este sentido una apropiada comparación de cepas silvestres con cepas de referencia y cepas domésticas del parásito permitirá explorar y entender no solo la propagación de estas sino también si las poblaciones de vectores y de parásitos comparten espacios, en otras palabras si existen intercambios genéticos y si estos podrían haber contribuido a la estructura actual del parásito. Desde un punto de vista epidemiológico y médico, es un

parámetro importante el poder evaluar la estabilidad en espacio y el tiempo de genotipos. Esta estabilidad depende directamente del nivel de los intercambios genéticos. De hecho dentro de un estricto marco clonal los clones son estables en el espacio y el tiempo, transmiten similares características biológicas generación tras generación y estas pueden ser cruciales en el ámbito médico.

Intercambios genéticos entre cepas fueron experimentalmente demostrados (Gaunt et al. 2003) y se descubrieron varias cepas híbridas en la naturaleza (Sturm & Campbell 2010). También, Barnabé & Brenière (2012) en su trabajo con microsatélites mostraron un nuevo caso de introgresión mitocondrial (TcV en TcI) en Bolivia. Entonces la exploración de la existencia de recombinaciones entre cepas nativas es importante para entender las vías de evolución del parásito.

En este contexto proponemos el estudio de 6 poblaciones de cepas silvestres de *T. cruzi* (TcI) procedentes de 6 pequeñas áreas geográficas pertenecientes a los departamentos de Cochabamba y de La Paz. Así se evaluará la diversidad genética intra e inter-poblaciones, su estructura y el nivel de los intercambios genéticos en poblaciones potencialmente panmícticas. Para esto utilizaremos un enfoque de multi secuenciación (MLST), usando genes mitocondriales y nucleares que nos permitirán explorar la presencia de recombinación y/o introgresión mitocondrial. Así mismo comparar con estudios realizados a través de marcadores microsatélites.

1.2. Planteamiento del problema

Recientemente se propuso la existencia de intercambios genéticos a nivel de poblaciones de *T. cruzi* salvajes a través de un análisis con microsatélites que son marcadores genéticos hipervariables (Barnabé et al. 2013). Si realmente no se puede rechazar la hipótesis de panmixia en algunas de estas poblaciones selváticas, deberíamos encontrar igualmente intercambios genéticos a otros niveles del genoma. Este trabajo

propone nuevos análisis genéticos de estas mismas poblaciones de *T. cruzi* salvajes en el que se tratará de responder las siguientes preguntas de investigación:

- ¿El nivel de polimorfismo genético de los genes nucleares y mitocondriales será suficiente para determinar genotipos diferentes dentro o entre las poblaciones?
- ¿Cuál es el nivel de polimorfismo de estos genes en comparación con los microsatélites?
- ¿Existen intercambios genéticos en estas poblaciones observables con el método MLST, que son marcadores supuestamente menos polimórficos que los microsatélites?
- ¿Se podría observar recombinación inter y/o intragénica y tal vez introgresión mitocondrial?
- ¿Existiría una estructura genética dentro de las poblaciones o estructura geográfica entre las poblaciones?

1.3. Hipótesis

Resultados previos con microsatélites cuestionaron el modo de reproducción de TcI en las poblaciones en estudio, lo que nos lleva a suponer que, si los marcadores nucleares MLST tienen suficiente variación, se podría confirmar o cuestionar la existencia de intercambios genéticos. Así mismo con la secuenciación de genes mitocondriales y nucleares, se podrá explorar la presencia de posibles eventos de introgresión mitocondrial.

En este sentido nuestra hipótesis de trabajo es, confirmar la existencia de panmixia dentro de las poblaciones nacionales de TcI selvático.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Analizar la diversidad genética intra e inter-poblaciones de cepas salvajes de *T. cruzi* (TcI) aisladas de seis poblaciones locales de Bolivia por el método MLST (Multi Locus Sequence Typing) y explicar la estructura genética y el modo de reproducción dentro de estas poblaciones.

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar 82 cepas provenientes de 6 poblaciones locales (2 del departamento de Cochabamba y 4 de La Paz) con la secuenciación de dos genes mitocondriales y seis genes nucleares.
- Corregir las secuencias, alinearlas, examinar las secuencias en términos de índices de variabilidad y estructuración geográfica.
- Construir árboles filogenéticos con cada gen con el método más adecuado.
- Hacer el análisis molecular de la varianza (AMOVA).
- Analizar las distancias genéticas y la diferenciación genética entre las 6 poblaciones.
- Estudiar el nivel de recombinación dentro las poblaciones (análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg).
- Comparar los presentes resultados con los obtenidos previamente con marcadores microsatélites.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

2.1.1. Histórico de la enfermedad

En 1907, Carlos Chagas, joven médico asistente del Dr. Oswaldo Cruz, fue el encargado de llevar a cabo una campaña contra la malaria en el estado de Minas Gerais-Brasil. Al examinar el contenido estomacal de un insecto hematófago (*Panstrongylus megistus*) conocido por los lugareños como "barbeiro", que abundaba en las casas, descubrió numerosos parásitos flagelados que se encontraban en las deyecciones de los insectos. Sospechaba que el parásito era capaz de infectar a los vertebrados. Dos años más tarde, Chagas observó por primera vez el parásito en sangre de una niña de dos años de nombre "Berenice", llamando la atención los aspectos agudos de la enfermedad. A partir de ese momento, Carlos Chagas desarrolló una obra monumental durante unos años para establecer el conocimiento básico de esta enfermedad.

Su trabajo impulsó al descubrimiento de la enfermedad en varios países de América latina a partir de la investigación de insectos vectores. Después de su muerte en 1934, la enfermedad de Chagas fue reconocida en varios países y estudios importantes se llevaron a cabo a continuación en Argentina por Salvador Mazza. En 1960, el reconocimiento de la enfermedad de Chagas como problema de salud pública impulsó a varios países a organizar el control. En 1991, una importante iniciativa de control anti vectorial fue iniciada por los países del Cono Sur. Los resultados positivos llevaron a los países andinos a la implementación de un programa similar que debería ampliarse a Centroamérica y México en los próximos años.

2.1.2. Distribución geográfica y prevalencia de la infección humana por *T. cruzi*

Entre las 80 enfermedades referidas como tropicales, la enfermedad de Chagas representa el problema de salud de mayor trascendencia en el continente americano. Es particularmente abundante en algunas partes de América Latina. La distribución de la enfermedad cubre el área tropical y sub-tropical de México a Argentina (World Health Organization, 1998) (Figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas (Morel & Lazdins, 2003)

En 1980 se estimaba que había entre 16 y 18 millones de infectados, con una incidencia anual de 300 000 nuevos casos con manifestaciones clínicas y características epidemiológicas variables (Senior 2007). En la actualidad afecta a unos 7 - 8 millones de personas, y se encuentran en riesgo de adquirir la infección aproximadamente 25 millones de personas, con 56 000 nuevos casos anuales y 12 000 muertes/año, de las cuales 30% a 40% o bien sufren o desarrollarán cardiomiopatía, mega síndromes digestivos, o ambos (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>). El riesgo de adquirir esta enfermedad está directamente relacionado con factores socio-económicos y culturales. Ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como

una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas del mundo (Murcia, Carrilero *et al.* 2013). Actualmente, se reportan con mayor frecuencia casos provenientes de ciudades de Latinoamérica, así como de EUA, Europa y Japón, debido a la migración de personas.

La prevalencia de la enfermedad de Chagas varía según el área geográfica, Bolivia siendo el país más afectado, con una tasa global en población general del 28,8% y hasta 45% en algunas zonas (Murcia *et al.* 2013). En Bolivia la enfermedad abarca aproximadamente el 60% del territorio en zonas de 300 m a 3000 m de altura de los departamentos de La Paz, Cochabamba, Tarija, Chuquisaca, Santa Cruz y Potosí (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15807&Itemid=). En 1985 el número de personas infectadas alcanzó 1,3 millones y el 26% de ellas desarrollaron signos de alteración de la frecuencia cardíaca (WHO, 1991). En algunas ciudades como Santa Cruz, más del 50% de los donantes de sangre se encontraban infectados (WHO, 2002). En los últimos 10 años, el número de nuevos casos ha disminuido considerablemente en América Latina a través de un control eficaz de vectores. La transmisión de la enfermedad de Chagas también se ha interrumpido en la mayor parte de Brasil, Chile y Uruguay (Organización Mundial de la Salud, 2002).

2.2. El agente patógeno

2.2.1. Taxonomía

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular flagelado perteneciente al:

- ✓ Phylum: Euglenozoa
- ✓ Clase: Kinetoplastida
- ✓ Orden: Trypanosomatida
- ✓ Género: *Trypanosoma*
- ✓ Especie: *Trypanosoma cruzi*

Aparte del núcleo, el parásito comprende un kinetoplasto, organela localizada en el mitocondrion celular, el cual contiene una red concatenada de ADN.

T. cruzi hace parte del grupo de stercorarian de tripanosomas cuyas etapas infectivas se desarrollan en el tracto digestivo de los insectos y contaminan a los mamíferos a través de las heces. El subgénero *Schizotrypanum* es el que representa a los tripanosomas que se multiplican en vertebrados de manera intracelular, por eso, el nombre completo de este parásito es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (World Health Organization, 2002).

2.2.2. Estadios evolutivos

Se trata de un protozooario flagelado que evoluciona en tres estadios morfológicos durante su ciclo de vida: tripomastigote, epimastigote y amastigote (Krautz, Kissinger et al. 2000) (Figura 2). En la forma móvil denominada **tripomastigote** (15µm - 25µm) el kinetoplasto está colocado en el polo anterior de la célula, de donde nace una membrana ondulante que se convierte en flagelo en la parte posterior; esta forma no se multiplica, se encuentra en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los insectos reducidos; es la forma infectante para el mamífero. El **epimastigote** es de aspecto fusiforme (18 µm -20 µm), su kinetoplasto está cercano al núcleo, posee una membrana ondulante más pequeña que termina también en un flagelo posterior; esta forma se presenta en el tubo digestivo del insecto vector donde se multiplica por bipartición. El **amastigote** es de forma redondeada (2µm – 2.5µm), con un gran núcleo excéntrico y un kinetoplasto en forma de bastoncillo encorvado que da origen al rizoplasto, el cual se convertirá en flagelo en las diversas formas evolutivas. El amastigote es la forma intracelular que invade los huéspedes mamíferos donde se multiplica profusamente por bipartición (Andrade & Magalhaes 1997) antes de transformarse en formas tripomastigotes cuando la célula se rompe para liberarlas en la circulación sanguínea. Este parásito puede encontrarse en animales salvajes, cumpliendo un ciclo silvestre, o bien en animales de granja y mascotas o en el hombre, cumpliendo un ciclo doméstico (Develoux, Lescure et al. 2009).

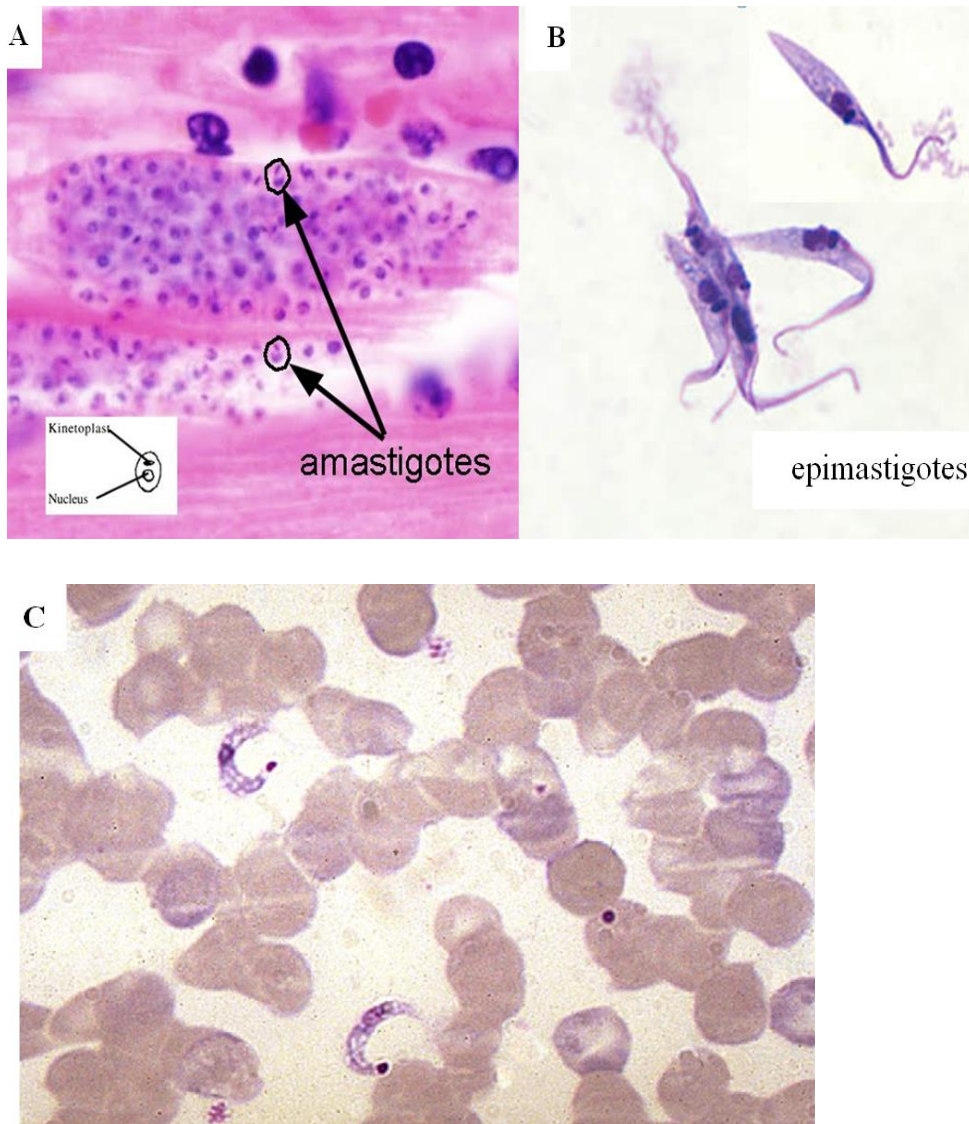


Figura 2. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi* a) Amastigotes en una célula de un tejido de musculo cardiaco b) Epimastigotes dentro el intestino medio de un triatomino. c) Trypomastigotes en la sangre (Dr J.-F. Pays).

2.2.3. Ciclo biológico del parásito

En el ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 3) están involucrados vertebrados que fungen como huéspedes y reservorios y un artrópodo como vector. El ciclo inicia cuando el triatomino al picar a un animal infectado, ingiere al parásito (estadio tripomastigote).

Dentro del triatomino y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. A mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria, finalmente durante aproximadamente 3-4 semanas, llegan a la ampolla rectal, donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para un nuevo huésped) alojándose en la parte terminal del tubo digestivo del insecto. La infección del mamífero inicia cuando el insecto defeca mientras se alimenta, liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces. Los tripomastigotes, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la picadura entre otros), invadiendo así los macrófagos que son probablemente las primeras células infectadas en el huésped (Nogueira & Cohn 1976). Dentro las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes, la célula se rompe y las formas son liberadas en los espacios intersticiales y en el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes tienen la habilidad de invadir otras células, donde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. Cabe mencionar que cualquier órgano del cuerpo puede ser invadido, pero particularmente las células de origen mesenquimatoso, en especial las miocárdicas, reticuloendoteliales y neurogliales. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con *trypanosomas* circulantes (<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15/capitulo.html>).

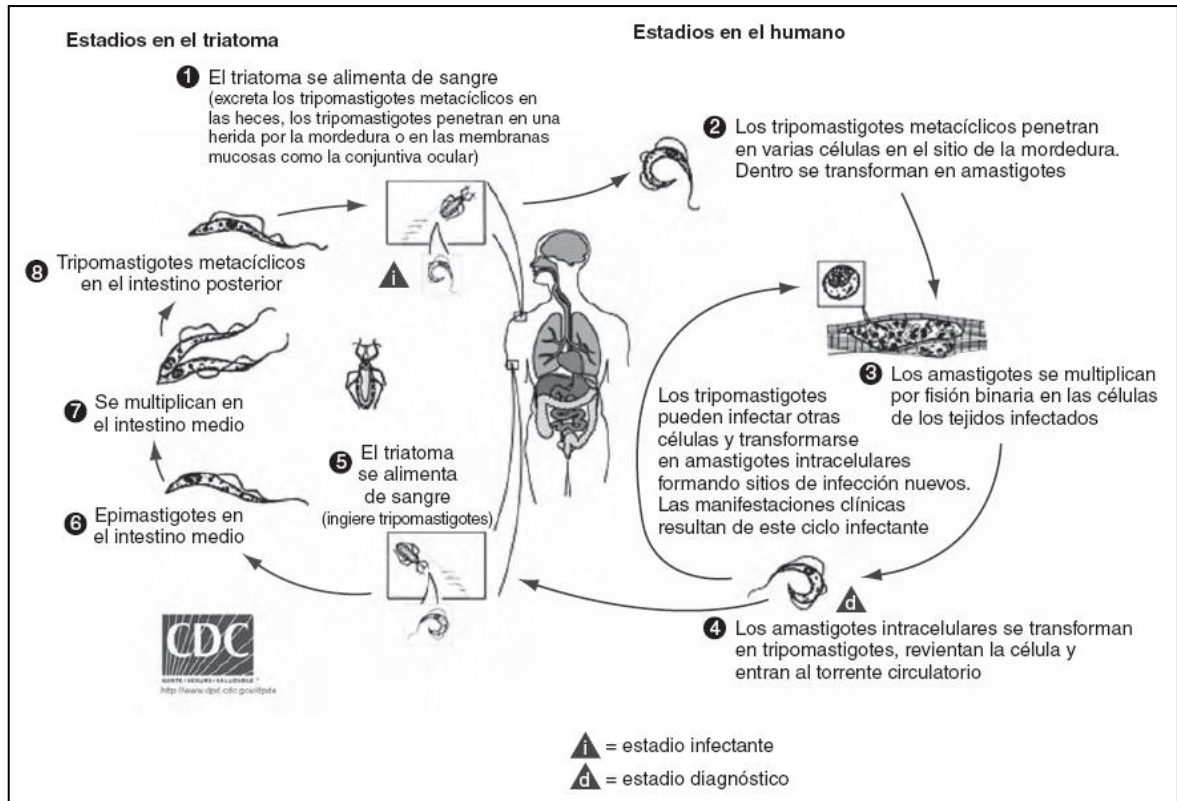


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15/capitulo.html>

2.3. El vector

Los triatominos son los únicos artrópodos de importancia epidemiológica, en lo que se refiere a la transmisión de la enfermedad de Chagas, son insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae. Cuentan actualmente con 141 especies de insectos, pero sólo unos pocos tienen un papel importante en la transmisión a los seres humanos. Entre las especies más reconocidas como vectores, se encuentran *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, dado que son consideradas las responsables de más de 80% de la transmisión en las áreas endémicas (Guhl, Pinto et al. 2009). Se encuentran ampliamente diseminados en todo el continente Americano, desde México hasta Argentina y Chile (Figura 4). Cumpliendo dos tipos de ciclos, selváticos y/o domésticos (Prata 2001), más del 50% de estas especies están naturalmente infectadas con *T. cruzi* (Schofield, 1994)

En Bolivia se reportaron 16 especies de triatominos distribuidas en 6 géneros (Cortez et al. 2007). Entre ellas *T. infestans* es el principal vector de la enfermedad como en otros países del Cono Sur. Así mismo se ha sugerido que *T. infestans* sería originaria de los valles andinos de Bolivia, donde sus poblaciones viven en asociación con animales silvestres (Noireau, Diosque et al. 2009; Waleckx et al. 2011; Panzera et al. 2014). proponiendo que *T. infestans* se ha diseminado a otros países de América, Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay por transporte pasivo después de colonizar el habitat humano en los Andes a través de la domesticación del cuy (Schofield, 1988). Otros trabajos proponen una dicotomía de las poblaciones “Andinas y no Andinas muy anterior a la colonización humana en el continente (Waleckx et al. 2011-2012; Panzera et al. 2014; Bargues et al. 2006). El riesgo de contraer la enfermedad está asociado con modos de vida inequitativos y de pobreza, comunidades con malas condiciones de existencia pobres e insalubres. Como consecuencia de los programas nacionales de control de los país del Cono Sur, la distribución de *T. infestans* disminuyó drásticamente desde los años 80, pero sigue persistente en varios países del Cono Sur (Schofield, Jannin et al. 2006).



Figura 4. Distribución geográfica de los principales vectores de *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2002)

2.4. Reservorios

Originalmente, la enfermedad de Chagas era una zoonosis que involucraba únicamente a triatominos y mamíferos salvajes en focos naturales, los humanos y los animales domésticos estaban ausentes. Como resultado del contacto humano con el vector y los cambios en los biotopos naturales, han permitido que el parásito se propague de ciclo silvestre a ciclos peridomiciliar y domésticos. Actualmente, hay más de 150 especies pertenecientes a 24 familias de mamíferos de ocho órdenes (Artiodactyla, Carnívoros, Quirópteros, Didelphimorphia, Perisodáctilos, Primates, Roedores y Xenarthra) (Lisboa, Xavier et al. 2009) domésticos y peri-domésticos infectados con *T. cruzi*. El importante papel desempeñado por un reservorio animal en ciclos domésticos y silvestres de *T. cruzi* está relacionado a su especie, su hábitat (silvestre, domicilio o peridomicilio), su dispersión, densidad de población, su distribución geográfica, su accesibilidad al vector, y la relación entre el parásito y el huésped reservorio (Organización Mundial de la Salud, 2002).

Ciclo doméstico, comprende triatominos domiciliarios y varios animales domésticos. La disponibilidad permanente de alimento hace que los triatominos vivan en las casas en un estrecho contacto con el hombre. Aunque la probabilidad de transmisión es baja para cada contacto humano-vector, una tasa de transmisión elevada es posible cuando el número de contactos es grande. La infección por *T. cruzi* es especialmente elevada en **perros**, **ratas** (*Rattus norvegicus* y *R. rattus*) y **ratones** (*Mus musculus*). En los países andinos los reservorios domésticos importantes del parásito incluyen a **conejos** y **cobayas** (Organización Mundial de la Salud, 2002). Así mismo las **aves** de corral, aunque resistentes a la infección, su hábitat (gallineros) constituye un refugio y fuente importante de alimento para los triatominos (Organización Mundial de la Salud, 2002).

Ciclo silvestre, para este ciclo intervienen numerosas especies de mamíferos arbóreos y terrestres. Aunque su papel no ha sido completamente probado, algunas de estas especies invaden las zonas péridomiciliarias donde tienen gran posibilidad de aumentar el riesgo de transmisión al hombre. Muchos mamíferos como, **marsupiales** (género *Didelphis* en particular) son un importante reservorio de *T. cruzi* en varios

países. Para el orden Edentata, se identificaron más de veinte especies y sub-especies infectadas con *T. cruzi*. En particular, el **armadillo** (género *Dasypus*) como *D. novemcinctus*, que contribuye largamente al mantenimiento de la infección en biotopos silvestres. Dentro los **roedores**, más de cincuenta especies y sub-especies están infectadas con el parásito contribuyendo a mantener el ciclo silvestre. Un gran número de especies de **murciélagos** como *Desmodus rotundus* o *Artibeus lituratus* son infectados con *T. cruzi*. Los murciélagos no solo mantienen el ciclo silvestre, estos pueden introducir nuevas cepas salvajes de *T. cruzi* en zonas domiciliarias al convertirse en una fuente de alimentación sanguínea para triatominos que cumplen ciclo doméstico. Los **carnívoros** silvestres y su importancia como reservorios no se conocen totalmente, pero se considera que tendrían un papel relativamente reducido. Finalmente, 22 especies de **primates** están infectados con *T. cruzi* con tasas de infección relativamente elevadas (hasta 45% en algunos países) (Organización Mundial de la Salud, 2002).

2.5. Modos de transmisión de la enfermedad

2.5.1. Transmisión a través de vectores

La forma más común y frecuente de contraer la infección en zona endémica consiste en la penetración del parásito a nivel de mucosas o de una herida en la piel y invasión intra celular (Figura 5). Esto es posible porque el vector infectado, posterior a la ingestión de sangre, defeca sobre la superficie de la piel y los parásitos contenidos en las heces del vector penetran por el sitio de la picadura a través del rascado o al ser llevados con las manos hasta la misma conjuntiva u otras mucosas. El período de incubación es aproximadamente de 4 a 15 días.

Como el termotropismo es el estímulo más poderoso para el redúvido en procura de alimento, este se siente atraído por el cuerpo caliente de su víctima y la pica mientras duerme. Si bien las picaduras, sobre todo las de *T. Infestans*, ocurren principalmente en la cara, se pueden hallar en cualquier otra área expuesta.

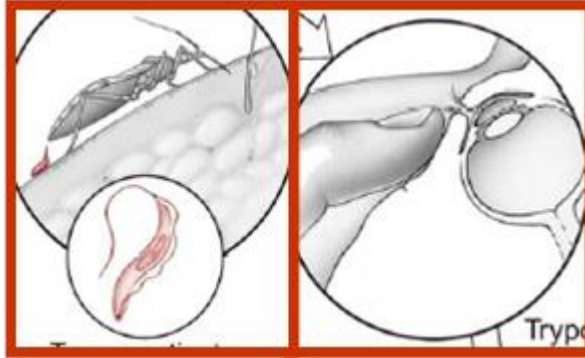


Figura 5. Ilustración del modo de transmisión vectorial por contaminación con deyecciones infectadas de los insectos vectores.

2.5.2. Transfusión sanguínea

La transfusión de sangre completa o de hemoderivados es la segunda forma más frecuente de adquirir la infección después de la transmisión vectorial en diversas zonas de América, siendo la principal vía de transmisión en áreas urbanas, donde no es habitual encontrar el vector. Aproximadamente un 20% de las personas que reciben una transfusión de un donante infectado adquieren la infección (<http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/promocion/migracion/docs/enfermedadChagas.pdf>).

2.5.3. Transmisión congénita

La vía de transmisión congénita o transplacentaria, se define como el paso de *T. cruzi* de la madre al feto a través de sangre materna, placenta, líquido amniótico o durante el parto; es una variedad de Chagas agudo sin puerta de entrada aparente que fue adquirido “in útero” a través de una madre en fase aguda o en fase crónica de la enfermedad de Chagas. El riesgo de transmisión está presente en cada uno de los embarazos, en cualquier semana de gestación (Bittencourt et al., 1967; 1992; Menezes et al., 1992; Moretti et al., 2005) e incluso en una segunda generación (Schenone et al.,

2001). Sin embargo, no todos los hijos de madres infectadas adquieren la infección, existen casos en los que *T. cruzi* no infecta la placenta ni el feto, o solo infecta la placenta y no así al feto (Moya et al., 1979; Moretti, 2005). Este mecanismo de transmisión adquiere relevancia porque llega a ser fuente continua de transmisión difícilmente prevenida durante los meses de gestación y que se comporta de manera muy silenciosa existiendo el riesgo de transmisión incluso en zonas donde no necesariamente la enfermedad de Chagas es endémica. Es así que traspasa fronteras y se traslada de zonas rurales hacia zonas urbanas la enfermedad de Chagas.

2.5.4. Otros

Entre otros mecanismos de transmisión son excepcionales, los casos transmitidos por vía oral, trasplante de órganos cuando no existe un control serológico del donante, uso de drogas endovenosas o como resultado de accidentes de laboratorio al manipular material biológico contaminado (Schmunis, Zicker et al. 1998). Por otra parte se ha sugerido también que la leche materna podría ser una posible vía de transmisión pero los pocos casos descritos parecen estar relacionados con contaminación de la leche por un sangrado mamario (Bittencourt 1992).

2.6. Patología

La enfermedad de Chagas pasa por 2 estadios sucesivos: una fase aguda y otra crónica (Prata 2001). La fase inicial de la infección dura entre 4-8 semanas y la fase crónica persiste durante toda la vida del hospedador (Rassi, Rassi et al. 2010).

2.6.1. Fase aguda

Durante esta fase, el paciente experimenta los siguientes síntomas y signos: fiebre, agrandamiento de los nodos linfáticos e inflamación unilateral de los párpados, esto se conoce como el signo de Romaña (Umezawa, Stolf et al. 2001). Puede presentarse una miocarditis aguda con una respuesta inflamatoria intensa adyacente a los nidos rotos de parásitos y daño a las células musculares; a veces se observan pseudoquistes con edema asociado. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no presentan estos síntomas y signos. Se pueden realizar diagnósticos inmunológicos –aunque no tan confiables– y moleculares en esta etapa. Además, se pueden observar los parásitos en el torrente sanguíneo.

2.6.2. Fase crónica

La fase crónica comienza generalmente con una forma indeterminada, que puede durar indefinidamente. Cuando se manifiestan los síntomas, se tienen dos tipos de patologías: cardíaca y digestiva. En la enfermedad cardíaca, se tiene un agrandamiento de todas las cámaras del corazón y un engrosamiento de las paredes de las cavidades, junto con arritmia y falla cardíaca. La tasa de muertes inesperadas por esta causa asciende a 37.5% mientras que el 58% experimenta signos claros de falla cardíaca y usualmente fallece en un periodo de 7 a 24 meses (Teixeira, Nascimento et al. 2006). La patología digestiva ocurre en aproximadamente 10% de los pacientes, e involucra varios mega-síndromes, entre los cuales destacan el megacolon y el megaesófago (Umezawa, Stolf et al. 2001). Se presenta un agudo dolor al tragar junto con disfagia, y el colon corre el riesgo de obstruirse y perforarse e iniciar una serie de infecciones, como la pericarditis. Una vez que existen degradación tisular y sistémica, en general el proceso se puede revertir muy poco, o muy lentamente dependiendo del estado del paciente.

2.7. Diagnóstico y control de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas ha sido siempre difícil y sigue siendo. De hecho, los síntomas son muy leves durante la fase aguda, por lo que es difícil el diagnóstico clínico de las personas enfermas. El diagnóstico de laboratorio de la infección por *T. cruzi*, puede realizarse por:

2.7.1. Diagnóstico de laboratorio por método directo

- **Observación microscópica al fresco**, Identifica la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, por observación directa, en una muestra de sangre periférica fresca u otro fluido.
- **Gota gruesa**, Permite la concentración de la muestra de sangre. Se colocan 3 a 4 gotas de sangre sin anticoagulante en un portaobjeto, las que luego se desfibrinan para posteriormente teñirse y ser observadas al microscopio, en busca de tripomastigotes de *T. cruzi*.
- **Método de concentración Microstrout**, Examen microscópico de la fracción leucoplaquetaria de la sangre total a partir de un capilar de microhematocrito cargado con sangre del paciente, en búsqueda de las formas tripomastigotes de *T. cruzi*.
- **Xenodiagnóstico**, El objetivo del xenodiagnóstico es detectar formas tripomastigotes de *T. cruzi* en las deyecciones de triatominos post succión de sangre infectada, utilizándose para ello ninfas de insectos libres de infección. No obstante, actualmente en la práctica no se la emplea, sino sólo para fines de investigación, cabe mencionar que tiene una sensibilidad aproximada del 98% a 100 % en la etapa aguda, y de 50% a 70% en crónica en condiciones óptimas.

2.7.2. Diagnóstico de laboratorio por método molecular

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, En los últimos años, la detección de ADN mediante la PCR se ha convertido en una alternativa; su realización requiere un tiempo superior al empleado en la observación directa pero es inferior al necesario para detección de la presencia del parásito mediante xenodiagnóstico. Existen numerosos blancos moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*. En diagnóstico, los blancos más utilizadas son la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto y la secuencia repetida de 195 pares de bases del ADN satélite. Como las diferencias de sensibilidad entre los métodos depende de la optimización de PCR ambas se encuentran representadas en un gran número. Sin embargo, la sensibilidad también depende del grado de parasitemia del paciente. Un resultado positivo mediante PCR confirma la infección, pero un resultado negativo no la descarta, siendo necesario realizar pruebas serológicas (Britto, Cardoso et al. 1993, Britto 2009). La PCR cuantitativa en tiempo real todavía no se utiliza mucho en el diagnóstico habitual debido a que la determinación de la carga parasitaria es útil, principalmente, en la etapa aguda y en el seguimiento de infecciones experimentales (Murcia, Carrilero et al. 2013). Además fue demostrado que la PCR puede ser de gran utilidad para el seguimiento post-tratamiento de la enfermedad (Flores-Chavez et al. 2006).

2.7.3. Diagnóstico de laboratorio métodos indirectos

- **Diagnóstico serológico.** Se basa en la determinación de la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito IgG anti-*T. cruzi*. Se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo el parásito (inmunofluorescencia indirecta (IFI)) o una mezcla compleja de antígenos de parásito (hemoaglutinación indirecta (HAI), ensayos inmunoenzimáticos

(ELISA). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos (WHO 2002).

- Entre los diferentes métodos comerciales disponibles, los más empleados son HAI, IFI y ELISA.
- Actualmente, no hay un “patrón de oro” que alcance el 100% de sensibilidad y especificidad, por lo que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, al menos, 2 técnicas de distinto principio y antígeno (WHO 2002). Cuando los resultados son discordantes es necesario realizar otras pruebas de confirmación y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden producir reacciones falsamente positivas.

Debido al antígeno empleado en estas técnicas convencionales es frecuente encontrar reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos, como *Leishmania spp.* o *Trypanosoma rangeli* (Ramirez, Lages-Silva et al. 2002, Frank, Fernandez et al. 2003). Otro de los inconvenientes de la serología convencional es la falta de capacidad para evaluar a los pacientes tras el tratamiento, ya que los anticuerpos detectados son de larga duración y la seroconversión no ocurre hasta pasados varios años después del tratamiento (Viotti, Vigliano et al. 2006).

Con el fin de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada se emplean, cada vez más, técnicas ELISA que utilizan proteínas recombinadas, antígenos purificados o péptidos sintéticos como antígeno. Recientemente se han descrito péptidos sintéticos que son reconocidos de forma específica por los sueros de los pacientes con enfermedad de Chagas y tendrían utilidad en la monitorización de la respuesta al tratamiento a corto plazo (Fernandez-Villegas, Pinazo et al. 2011). Otros marcadores permiten, además del diagnóstico, el conocimiento del estado del paciente. Así, los títulos de anticuerpos frente al epítipo 3973 son mayores en los pacientes en fase crónica sintomática

(alteraciones cardíacas o digestivas) que en fase crónica asintomática (Thomas, Fernandez-Villegas et al. 2012).

2.8. Tratamiento

Es importante destacar que, hasta la fecha, no se ha encontrado una cura definitiva para la enfermedad de Chagas, las posibles reinfecciones en las áreas endémicas y la falta de marcadores clínicos han dificultado el conocimiento real de la eficacia del tratamiento. Sin embargo, se han desarrollado drogas capaces de disminuir el avance de la infección con resultados interesantes. El tratamiento actual involucra la utilización de dos sustancias: nifurtimox y benznidazol (Develoux, Lescure et al. 2009), cuya actividad anti-*T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de 3 décadas desde 1965 (Jannin & Villa 2007). Estos medicamentos han probado ser los más efectivos hasta la fecha. El resto de fármacos, cuya utilidad es discutida para tratar la enfermedad de Chagas aguda, como el alopurinol, el fluconazol o el itraconazol, se han estudiado en animales de laboratorio y, en menor medida, en humanos (Munoz, Murcia et al. 2011).

2.9. Prevención y control

La enfermedad de Chagas no puede ser erradicada puesto que es una zoonosis. La gran cantidad de animales reservorios y especies vectores hace imposible eliminar todas las fuentes de infección. Debido a la escasa eficacia del tratamiento farmacológico y a la inexistencia de una vacuna, el control de la transmisión por *T. cruzi* en países endémicos depende necesariamente de la disminución de la población domiciliaria del vector a través de los programas de fumigación con insecticidas, mejoras de las condiciones de la vivienda y sensibilización de las personas vulnerables. Estas medidas y el cribado serológico de donantes de sangre han disminuido de manera notable la transmisión del parásito en muchos países endémicos. Es aconsejable que los turistas y cooperantes en zonas rurales de países endémicos no duerman en casas con condiciones

de riesgo. Las mosquiteras y los repelentes de insectos son útiles para impedir la transmisión de la enfermedad.

El Programa Nacional de Chagas constituye uno de los programas fundamentales del Plan estratégico de Salud en Bolivia por su impacto sobre la morbilidad, mortalidad y reducción de la esperanza de vida. Instaurado desde el año 2000 ha permitido una importante reducción del territorio a riesgo de transmisión vectorial e importante disminución de la población infectada en relación de la población total de aproximadamente 10 millones y medio para el año 2010 (<http://www.ops.org.Bo/textocompleto/nchagas32348.pdf>). Este programa comprende medidas relacionadas con el fumigado de las casas y el entorno con insecticidas, mejora de las viviendas, la promoción de medidas preventivas personales como el empleo de mosquiteros; buenas prácticas higiénicas en la preparación, el transporte, el almacenamiento y el consumo de los alimentos; tamizaje de la sangre para transfusión; control de los recién nacidos de las madres infectadas, capacitación del personal local; promoción de la participación social; investigación en diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, se ha generado mucha preocupación por parte de INCOSUR la descripción de nuevos focos silvestres de *T. infestans* en los Andes y Chaco bolivianos (Noireau et al, 1997, 2000, Buitrago et al, 2010, Waleckx et al, 2012), debido a que podrían tener incidencia en el éxito de la lucha y control contra la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en la región. En efecto, los triatomos silvestres podrían penetrar ocasionalmente en las casas, entrar en contacto con los humanos y transmitir nuevas cepas silvestres de *T. cruzi* (Noireau et al. 2009). Como muestra un reciente estudio acerca del riesgo de transmisión vectorial que resulta de la re-infestación en hábitats humanos por poblaciones silvestres de *T. infestans* en Bolivia (Brenière et al. 2013).

2.10. Estructura genética de *trypanosoma cruzi*

2.10.1. Variabilidad genética

T. cruzi es un agente patógeno para el cual la evolución y estructura de la población se encuentran entre los mejores estudiados, aunque no necesariamente la mejor comprendida. Diferentes estudios que incluyen marcadores biológicos, bioquímicos y moleculares han demostrado que *T. cruzi* es un taxón altamente heterogéneo (Macedo & Pena 1998, Macedo, Pimenta et al. 2001, Devera, Fernandes et al. 2003), es una especie muy polimórfica que muestra una gran diversidad fenotípica y genética. Durante años prevaleció la idea de que las poblaciones de *T. cruzi* no podían ser agrupadas en “clusters” discretos representando taxones naturales dentro de la especie (<http://www.fiocruz.br/chagasesp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>). Más tarde, fue propuesta una estructura multiclonal compleja afirmando que *T. cruzi* es una especie con reproducción básicamente clonal permitiendo en algunas ocasiones la presencia de híbridos entre diferentes clones (Tibayrenc, Hoffmann et al. 1986, Tibayrenc, Kjellberg et al. 1990).

Los primeros estudios de diversidad genética fueron descritos en Brasil por medio de análisis de variantes electroforéticas de enzimas, donde se agruparon poblaciones de *T. cruzi* aisladas de diferentes ecotopos (Miles, Toyé et al. 1977), de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos idénticos, los cuales recibieron el nombre de zimodemas. Este estudio pionero reveló diferencias genéticas sustanciales entre los parásitos en ciclos de transmisión silvestre y doméstica simpátricas. Las variantes descritas fueron designadas como zimodemas I, II y III y abrieron la puerta a la investigación sobre la etiología y los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas, permitiendo estudios comparativos y la influencia de las asociaciones huésped-parásito-vector.

En las dos décadas siguientes, varios autores procedieron a caracterizar aislamientos del parásito aplicando otros métodos moleculares como RAPD's, PCR

RFLPs, secuenciación de genes y microsatélites, entre otros. Como resultado, se reportó una importante variabilidad genética en los diferentes aislamientos del parásito y a su vez se generó una gran confusión en la denominación de los diferentes grupos propuestos. En el año 1999 durante el Simposio Internacional en conmemoración de los 90 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, realizado en Río de Janeiro, Brasil se estableció por primera vez un consenso internacional sobre la nomenclatura de *T. cruzi* (Recommendations from a satellite meeting, 1999), se acordó la inclusión de dos linajes genéticos diferentes, el linaje *T. cruzi* I (TcI) como un grupo genético homogéneo y el *T. cruzi* II (TcII) revelado por los estudios de isoenzimas y dimorfismos en el gen mini-exón y el dominio divergente del ADNr del parásito (Tibayrenc & Ayala 1988, Souto, Fernandes et al. 1996).

Posteriormente en el año 2000, Barnabé C. y Brisse S., utilizando clones de *T. cruzi* representativos de los dos linajes mayores y procedentes de variadas áreas geográficas, caracterizaron mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y RAPD, 5 subdivisiones dentro de TcII, designándolas 2a, 2b, 2c, 2d y 2e, y sin establecer subgrupos en TcI (Barnabé, Brisse et al. 2000). Esta subclasificación corresponde a linajes filogenéticos que poseen una divergencia predominante, mantenida a través de una evolución clonal ancestral. A continuación en el año 2003 Michel Tibayrenc, dentro de estas nuevas divisiones genéticas, incluye el concepto de Unidades de Tipificación Discreta (DTU), las cuales designan a un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa, y pueden ser identificadas por medio de marcadores moleculares o inmunológicos comunes. El mismo autor, por medio de dendrogramas basados en el análisis de MLEE y RAPD distinguió 6 clusters genéticos o DTUs, nombradas como *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI), y recientemente reportado un grupo adicional que sólo se encuentra en murciélagos TcBat. Estos 6 DTUs, proveen un excelente modelo para estudios evolutivos, haciendo posible la evaluación del impacto de la evolución clonal predominante de *T. cruzi* y su relación con las propiedades biomédicas de esta parasitosis. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre o domiciliar.

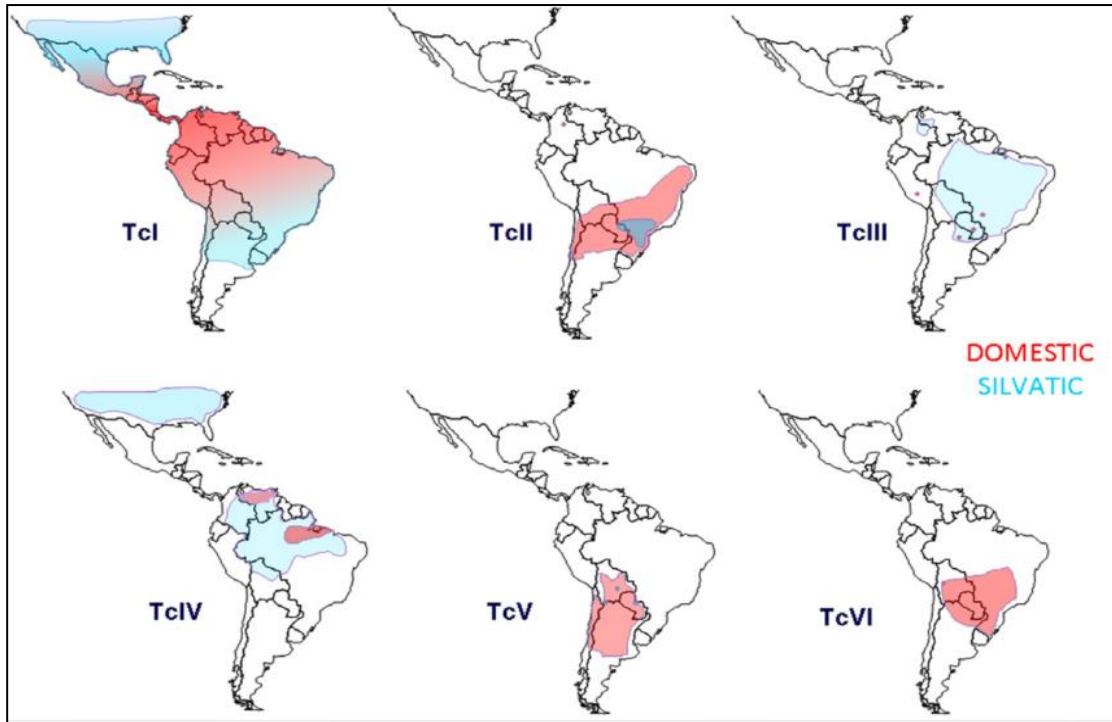


Figura 6. Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre (Zingales, Miles et al. 2012) o domiciliario

2.10.2. Evolución de *T. cruzi* modelo clonal

El estudio del modo de reproducción planteó el análisis de los intercambios de genes (flujo genético) entre cepas de *T. cruzi* a partir de los datos isoenzimáticos. Tibayrenc y colaboradores propusieron un análisis original basado sobre la hipótesis de poblaciones panmícticas porque es la única situación para la cual las probabilidades estadísticas están bien establecidas. En ninguna población los autores obtuvieron estadísticas en conformidad con la hipótesis de panmixia. Consecuentemente, propusieron la hipótesis clonal como modelo de reproducción de este parásito (Tibayrenc 1995). En marco de este modelo, una “especie clonal” se refiere en todos los casos que genotipos multilocus descendientes son virtualmente idénticos a los del genotipo inicial. El parámetro principal se centra en la inhibición de recombinación genética. En este sentido se ha demostrado que la especie *T. cruzi* muestra enteramente todos los signos de una típica estructura de población clonal: desviaciones de expectativas panmícticas, fuerte desequilibrio de ligamiento (asociación no aleatoria de

los genotipos en diferentes loci) dentro y especialmente entre las DTU, y la división en grupos genéticos discretos (DTU).

Sin embargo con la reciente evidencia de eventos de recombinación parcial o más convencional en especies diploides incluyendo hibridación e introgresión mitocondrial (incorporación de genes de un set de poblaciones diferenciadas en otra), entre las DTUs o dentro de DTUs han cuestionado este modelo (Machado & Ayala 2001, Barnabé & Brenière 2012). Estudios recientes revelaron dos incidencias de introgresión mitocondrial inter-DTU (entre TcI y TcIV y entre TcIII y TcIV), indicativo de múltiples eventos de intercambio genético en *T. cruzi* que involucran intercambio del ADN mitocondrial sin intercambio de material nuclear (Lewis, Llewellyn et al. 2011, Messenger, Llewellyn et al. 2012). Del mismo modo se reportó un nuevo caso de introgresión mitocondrial (TcV en TcI) encontrado por primera vez en Bolivia (Barnabé & Brenière 2012). Además el último trabajo desarrollado en Bolivia sobre análisis de poblaciones silvestres aisladas de *T. infestans* silvestres, muestra casos de ausencia del rechazo de la hipótesis de panmixia (Barnabé, Buitrago et al. 2013).

De esta manera, afirmar que *T. cruzi* es una especie básicamente clonal significa ni que la recombinación es totalmente ausente en las poblaciones naturales del parásito, ni que éste tiene impacto en la escala evolutiva, sino que representa un evento demasiado raro para romper el patrón predominante de clonalidad. Según la última revisión de Tibayrenc y Ayala (2013), La definición de “evolución clonal” debe entenderse que *T. cruzi* lleva este tipo de propagación de manera preponderante (PCE = “preponderant clonal evolution”), es decir que los intercambios genéticos son extremadamente restringidos, pero no están ausentes. Algunos ciclos de transmisión localizados sugieren que la recombinación genética se produce dentro las DTU de *T. cruzi* (Carranza, Valadares et al. 2009, Ocana-Mayorga, Llewellyn et al. 2010). La posibilidad de intercambio genético limitado entre las DTU es también objeto de debate (Lewis, Llewellyn et al. 2011). La reproducción de *T. cruzi* sigue siendo cuestionada, y se trata de explorar cual son los impactos evolutivos de los diferentes modos de reproducción.

2.10.3. Modelos para el origen de las DTUs híbridas

T. cruzi es predominantemente diploide (El-Sayed, Myler et al. 2005) y el método de replicación de las células es la fisión binaria, es decir, es un proceso asexual. Bajo el modelo clonal nuevas DTUs evolucionarían con la acumulación de mutaciones discretas, no afectadas por los acontecimientos poco frecuentes de intercambio genético. Sin embargo, consistente con la salvedad que pueden ocurrir algunos eventos de intercambio genético, la evidencia de heterocigocidad en la naturaleza de *T. cruzi* ha surgido a través del estudio de secuenciación de varios genes (Bogliolo, Lauriapires et al. 1996, Carrasco, Frame et al. 1996, Souto, Fernandes et al. 1996, Brisse, Barnabé et al. 1998).

La heterocigocidad observada en cepas de TcV y TcVI sugieren que estas DTUs son híbridos derivados de TcII y TcIII (Sturm, Vargas et al. 2003, Sturm & Campbell 2009). Las DTUs restantes, TcI, TcII, TcIII y TcIV muestran homocigocidad alélica sustancial. Si bien el principio de la teoría clonal todavía puede explicar el modo común de la expansión de la población de *T. cruzi*, los nuevos modelos incorporan eventos de hibridación para explicar la estructura de población existente, que incluye las DTUs híbridas (Westernberger, Barnabé et al. 2005, de Freitas, Augusto-Pinto et al. 2006). TcI y TcII son los grupos más distantes genéticamente. El linaje evolutivo de TcIII y TcIV es actualmente objeto de debate. Basado en la secuencia de genes nucleares individuales, Westernberger y colaboradores sugirieron que un evento antiguo de hibridación se produjo entre TcI y TcII seguido por un largo período de propagación clonal y erosión del genoma, llevando a la existencia de las DTUs TcIII y TcIV con pérdida de heterocigocidad, seguido por un segundo evento de hibridación más reciente entre TcII y TcIII para producir a TcV y TcVI, llamado modelo de “dos hibridaciones” (Westernberger, Barnabé et al. 2005). Por otra parte, De Freitas y colaboradores sugieren que TcIII y TcIV tienen una ascendencia evolutiva separada con secuencias mitocondriales que son similares entre sí, pero distintas de TcI y TcII, con dos acontecimientos recientes de intercambio genético entre TcII y TcIII produciendo TcV y TcVI con retención del genoma mitocondrial de TcIII en ambos casos, llamado modelo

de “tres ancestros” (de Freitas, Augusto-Pinto et al. 2006). Así, ambos modelos incorporarían dos eventos de hibridación.

El análisis de polimorfismos al nivel de los nucleótidos (SNPs) entre los seis DTUs por tipificación de MLST reveló cuatro clases de distintas secuencias de DNA en lugar de seis, llamadas haplogrupos (Machado & Ayala 2001, Sturm, Vargas et al. 2003, Broutin, Tarrieu et al. 2006). Dos de ellos, estaban siempre presentes en TcV y TcVI, lo que confirma el carácter predominantemente heterocigoto de sus alelos.

Los patrones de nucleótidos en cada haplogrupo TcV y TcVI se asemejan a los alelos de TcII y TcIII (Machado & Ayala 2001, Brisse, Henriksson et al. 2003, Westenberger, Barnabé et al. 2005, Lewis, Llewellyn et al. 2011, Yeo, Mauricio et al. 2011), confirmando a TcII y TcIII como los tipos parentales más probables. Sin embargo, los datos de diferentes MLST indican que las células parentales TcIII incluyen caracteres derivados de TcI y TcII (Sturm, Vargas et al. 2003, Elias, Vargas et al. 2005, Tomazi, Kawashita et al. 2009). Así TcIII, TcV y TcVI, podrían ser el producto de un evento de hibridación (Westenberger, Barnabé et al. 2005, Ienne, Pedroso et al. 2010).

La principal diferencia entre los modelos de dos hibridaciones y tres ancestros es si TcV y TcVI son la progenie de un evento único de hibridación incorporando los alelos de TcI adquiridos a través de TcIII (Westenberger, Barnabé et al. 2005), o la progenie de dos eventos de hibridación con exclusión del genoma de TcI (de Freitas *et al.*, 2006). La participación de TcI en la generación de las líneas existentes heterocigotas es apoyado por las secuencias de maxicírculos (Ruvalcaba-Trejo & Sturm 2011), datos de MLST (Tomazi, Kawashita et al. 2009), datos de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Rozas, De Doncker et al. 2008) y secuencias de DNA satélite de 195 pb y su distribución (Elias, Vargas et al. 2005, Ienne, Pedroso et al. 2010). Por el contrario, genes de maxicírculos codificados en la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1) (Machado & Ayala 2001, de Freitas, Augusto-Pinto et al. 2006), análisis de microsatélites (de Freitas, Augusto-Pinto et al. 2006) y algunos otros marcadores nucleares (Machado & Ayala 2002, Rozas, De Doncker et al. 2007) no detectaron participación de TcI. La comparación de la nueva secuencia del genoma de la cepa Sylvio X 10/1 (Franzen, Ochaya et al. 2011), representativa de TcI, comparada con la de la cepa CL Brener, un híbrido TcVI que

abarca tanto genomas TcII y TcIII (El-Sayed, Myler et al. 2005), ha confirmado que TcIII tiene un promedio mayor de similitud genética a nivel de secuencia del genoma con TcI que con TcII. Esta observación no es inconsistente con la conclusión anterior que TcIII puede ser el producto de una hibridación antigua entre TcI y TcII, como se evidencia en el modelo de dos hibridaciones (Elias, Vargas et al. 2005, Westenberger, Barnabé et al. 2005).

2.10.4. Diversidad genética dentro de las DTUs

Después de diez años de investigación enfocados a comprobar si TcI era un grupo homogéneo, varios marcadores moleculares han demostrado la existencia de una enorme variabilidad genética dentro de *T. cruzi* I (Figura 7). Es el más abundante y heterogéneo de todas las DTUs, se encuentra en toda la gama de distribución del vector (triatomino), y estaría asociada con los ciclos selváticos y domésticos.

El período de divergencia entre TcI y TcII aún no está por completo dilucidado; se estima entre 88 y 37 millones de años sobre la base de los primeros estudios con la subunidad pequeña de rDNA (Briones, Souto et al. 1999, Kawashita, Sanson et al. 2001) y entre 16 y 3 millones de años atrás en base a estudios de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (DHFR-TS) y genes tripanotión reductasa (TR) (Machado & Ayala 2002). Como era de esperar de un parásito tan antiguo y disperso, la diversidad genética se ha acumulado dentro de TcI. El primer reconocimiento de la heterogeneidad TcI se manifiesta en el esquema de tipificación de isoenzimas (clonets) propuesto por Tibayrenc y colaboradores mediante el cual se asignaron 25 genotipos a TcI, con un número mucho más bajo asignado a los otros cinco DTUs (Tibayrenc, Ward et al. 1986). El tamaño de la muestra podría haber representado un factor de confusión inicial, pues en la actualidad existen evidencias que la diversidad sustancial también se ha acumulado dentro de otros linajes de *T. cruzi* (Machado & Ayala 2001, Westenberger, Sturm et al. 2006, Llewellyn, Lewis et al. 2009, Marcili, Lima et al. 2009). El acceso a las nuevas técnicas de genotipificación de alta resolución ha resultado en un resurgimiento del interés en la delimitación de TcI dentro de la diversidad de las DTUs.

La principal observación de la mayoría de los análisis de diversidad de TcI en el norte de América del Sur, es la subdivisión aparente entre los ciclos domésticos y selváticos de transmisión (Saravia, Holguin et al. 1987, Herrera, Bargues et al. 2007, Falla, Herrera et al. 2009, Llewellyn, Lewis et al. 2009, Ocana-Mayorga, Llewellyn et al. 2010). Sin embargo, la compilación de datos de estos estudios se vio frustrado por las limitaciones de las diferentes técnicas empleadas para la genotipificación. Ciertos tipos de datos genéticos de la población, especialmente los derivados de microsatélites y loci isoenzimáticos, son difíciles de estandarizar entre los diferentes estudios.

En Bolivia se observa que en el ciclo doméstico circulan de manera dominante dos grupos de clones de *T. cruzi*: TcI y TcV (Tibayrenc & Brenière, 1988; Veas, Cuny et al. 1990; Brenière et al 1995; Brenière et al. 1998). Pero en el ciclo silvestre se ha identificado solo el grupo genético TcI en los focos silvestres del valle de Cochabamba, tanto en *T. infestans* como en los mamíferos asociados (Cortez, Pinho et al. 2006), datos que fueron confirmados recientemente en los focos silvestres andinos (Brenière et al. 2012). Así mismo, el intercambio genético también se ha demostrado experimentalmente en poblaciones adentro de TcI (Gaunt, Yeo et al. 2003) y se ha informado la observación de patrones de isoenzimas que sugieren el intercambio genético en los aislados naturales de TcI (Carrasco, Frame et al. 1996). Por otra parte una sub estructuración de TcI en 4-5 grupos (TcIa-e) ha sido propuesta detectando una cierta correlación entre estos sub-grupos y ciclos de transmisión en Colombia (Herrera, Bargues et al. 2007, Herrera, Guhl et al. 2009). Sin embargo esta sub-clasificación de TcI queda un gran punto de debate a raíz de nuevos análisis (Herrera et al. 2013)

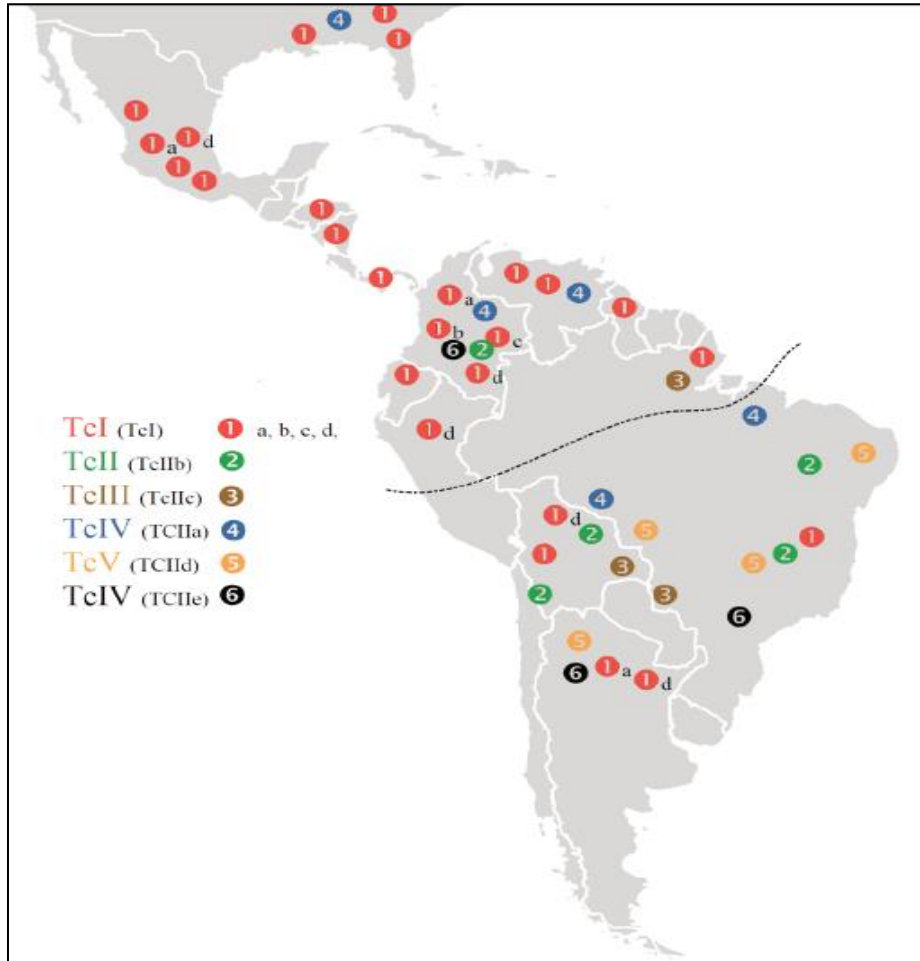


Figura 7. Distribución geográfica de las DTU's de *Trypanosoma cruzi* en el Continente Americano. Tomado de Patterson y Guhl, 2010

2.10.5. Patogénesis de la enfermedad de Chagas y las DTU

El propósito principal para la caracterización molecular de *T. cruzi* debe estar dirigido hacia su asociación con la clínica y la patogénesis de la enfermedad así como al esclarecimiento de los diferentes escenarios de transmisión.

El estudio de la epidemiología molecular de *T. cruzi* ha permitido establecer el posible efecto de las diferentes DTUs en el desarrollo clínico de la enfermedad de Chagas. En este sentido Andrade (1974) intentó discriminar morfológicamente a varios fenotipos de *T. cruzi* y estudiar su comportamiento en modelos murinos utilizando criterios de virulencia (capacidad de multiplicación en el huésped) y patogenicidad (capacidad de producir lesiones en los tejidos y la respuesta

inmunológica, así como causar muerte en ratones experimentalmente infectados) (Andrade, 1974). Estos estudios definieron tres fenotipos principales en las cepas (Andrade, Brodskyn et al. 1983), posteriormente designados como 'biodeamas' I-III (Andrade & Magalhaes 1996), de la siguiente manera:

Biodema tipo I: Cepas con tasas de multiplicación rápida, máxima parasitemia y mortalidad de 7 a 11 días después de la infección; predominio de formas delgadas, y macrofagotropismo durante la fase aguda de la infección. Alteraciones neuronales más frecuentes e intensas en las infecciones con biodeamas tipo I. Sus patrones de zimodemas corresponden a cepas Z2b (TcV), una variante de la Z2 (TcII).

Biodema tipo II: Cepas con tasas de multiplicación lenta y picos irregulares de parasitemia de 12-20 días después de la infección. Cuando las tasas de mortalidad alcanzan un valor máximo se observa predominio de formas amplias, miotropismo, con afectación predominante del miocardio. Sus patrones de zimodemas corresponden a cepas Z2 (TcII).

Biodema Tipo III: Cepas de multiplicación lenta con picos de parasitemia tardíos y altos 20-30 días después de la infección y mortalidad tardía, por lo general 30 días después de la infección; predominio de formas amplias y miotropismo, con participación del músculo del miocardio y esquelético. Sus patrones de zimodemas corresponden a cepas Z1 (TcI).

Tibayrenc y colaboradores emprendieron a largo plazo los estudios comparativos sobre la asociación entre la diversidad genética sub-específica de *T. cruzi* y las propiedades biológicas del parásito, incluyendo el comportamiento en cultivos celulares de mamíferos y axénicos, sensibilidad a los fármacos *in vitro*, transmisión a través del insecto vector y patogenicidad en ratones (Laurent, Barnabé et al. 1997, de Lana, da Silveira Pinto et al. 1998, Revollo, Oury et al. 1998). El patrón general es que las DTUs exhiben diferentes propiedades biológicas estadísticamente diferentes, pero con cierta superposición entre ellas. Curiosamente, en varios casos, la mezcla de dos clones se comportaron de manera diferente a una simple suma de sus comportamientos, sugiriendo la interacción entre genotipos (Pinto, de Lana et al. 1998).

Como una aproximación a la base molecular de fondo de las diferencias biológicas entre las DTUs, Tellería et al, (2010) realizaron una cartografía de carácter

filogenética de la expresión genética (diversidad proteómica) entre los seis DTUs de *T. cruzi*. Los autores encontraron una correlación entre las distancias genéticas medidas por los diferentes marcadores (MLEE, RAPDs, MLST) y las diferencias proteómicas entre las DTUs, que evidencian una estrecha correlación entre la evolución genética y la divergencia proteica. Al mismo tiempo, identificaron varias proteínas con expresión específica según la DTU.

Las implicaciones de estos estudios en el desarrollo de las formas clínicas de la enfermedad de Chagas son de gran importancia y sugieren la necesidad de adelantar nuevas investigaciones ecofilogeográficas mediante mejores marcadores moleculares, con el fin de implementar estrategias dirigidas a mitigar la enfermedad de Chagas en el continente.

2.10.6. MLST

Como consecuencia de la recombinación genética limitada de *T. cruzi*, genotipos multilocus persisten, con la estabilidad en el espacio y el tiempo. La estabilidad de los genotipos multilocus es la condición necesaria para cualquier enfoque de epidemiología molecular (tipificación de la cepa). En este sentido muchos métodos de tipificación se han aplicado al seguimiento epidemiológico, pero no hay consenso sobre cuál debe ser utilizado. Entre los marcadores moleculares más estudiados podemos destacar: Electroforesis multilocus de Enzimas (MLEE) (Barnabé, Brisse et al. 2000), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Brisse, Dujardin et al. 2000) y reacción en cadena de polimerasa con un único oligonucleótido en condiciones de baja astringencia (*LSSP-PCR*), entre otros (Zingales, Stolf et al. 1999, Lewis, Ma et al. 2009, Luna-Marin, Jaramillo-Londono et al. 2009). Y a pesar de que han proporcionado información muy valiosa sobre la genética de poblaciones, la evolución y la estructura de *T. cruzi*, estos métodos sufren de varios inconvenientes, tales como la falta de portabilidad y reproducibilidad entre laboratorios.

Tipificación por secuenciación multilocus (MLST) es un método originalmente desarrollado para describir especies bacterianas y luego utilizado para describir organismos diploides como *Candida spp.* (Bougnoux, Morand et al. 2002),

Batrachochytrium dendrobatidis (Morehouse, James et al. 2003), así como *Leishmania spp.* (Mauricio, Yeo et al. 2006). El método es altamente discriminatorio se basa en el análisis del polimorfismo nucleotídico de fragmentos internos de genes estructurales (por lo general entre cinco y siete fragmentos). Diferentes secuencias para cada locus se consideran como alelos distintos, y en conjunto definen un perfil alélico multilocus para cada muestra. Este enfoque, basado en la secuenciación automática de nucleótidos de ADN, tiene la ventaja de minimizar la interpretación subjetiva de los datos (Tavanti, Gow et al. 2003), es de interés muy variable, los datos de las secuencias no son ambiguas, lo que minimiza los errores de interpretación, método fácil, y no está sometidos a limitaciones de cada tipo de marcador en contraposición a las técnicas basadas en imágenes. Es un método electrónicamente portátil y puede ser compartido entre laboratorios a través de Internet creando bases virtuales de datos. En este contexto, el enfoque MLST representa un excelente candidato para convertirse en el estándar de oro para la tipificación genética de *T. cruzi* con producción adecuadas para estudios filogenéticos y epidemiológicos, en particular cuando un gran número de aislamientos de fuentes variadas son objeto de estudio.

MLST fue diseñado originalmente para las especies haploides, *T. cruzi* es organismo diploide y como tal hace que el análisis MLST de heterocigosidad sea más complicado. La heterocigosidad de un electroferograma se puede deducir por un pico doble (con dos bases superpuestas) en el mismo sitio bi-alélico variable (Tavanti, Gow et al. 2003). A partir de estos datos se puede inferir relaciones evolutivas, y detectar genes mosaico, dentro o entre loci de genes homocigotos (Subileau, Barnabé et al. 2009). El enfoque MLST para *T. cruzi* fue utilizado por primera vez por Machado y Ayala utilizando dos loci nucleares (Machado & Ayala 2001) en su estudio de recombinación genética en poblaciones naturales de *T. cruzi* y esto ahora se está ampliando a otros objetivos adicionales (Subileau, Barnabé et al. 2009). Aun no se establecido un patrón de genes MLST estandarizado. Recientemente, se ha desarrollado en paralelo dos esquemas MLST para *T. cruzi*, cada uno de ellos basados en diferentes genes (Yeo, Mauricio et al. 2011, Lauthier, Tomasini et al. 2012). Ambos esquemas muestran un poder discriminatorio alto y son capaces de diferenciar claramente las principales DTU de *T. cruzi*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Origen geográfico de las poblaciones

Se estudiaron seis poblaciones de *T. cruzi* aisladas de *T. infestans* silvestres procedentes del Este de la Cordillera Andina Boliviana, en los valles altos interandinos de la eco-región Bosques Secos Interandinos caracterizada por un clima templado, veranos húmedos e invierno seco. Cuatro de ellas son ubicadas en el departamento de La Paz: Luribay (17°3'54.90"S / 67°39'53.85"O), Mecapaca (16°42'45.90"S / 67°59'27.13"O) y dos poblaciones de Sapini (Sap-Sap, 16°48'47.23"S / 67°42'9.83"O; y Sap-Cosi, 16°49'50.00"S / 67°42'22.20"O), mientras que las otras dos poblaciones se encuentran en el departamento de Cochabamba: Quillacollo (Qui-Urk, 17°25'29.00"S / 66°17'45.20"O y Qui-Bsia, 106 17°25'28.81"S / 66°15'52.75"O). Las distancias entre las poblaciones se muestran en la Figura 8.

3.2. Preparación del ADN

Se aislaron seis poblaciones silvestres de *T. cruzi*, que en conjunto incluyen 80 cepas de un total de 116 analizadas, que fueron previamente asignadas a la DTU TcI con el método de PCR multiplex del miniexón (Aliaga, Brenière et al. 2011) y previamente analizadas con marcadores microsatelite mostrando que puede haber panmixia en cuatro de estas poblaciones (Barnabé, Buitrago et al. 2013).

Además se utilizaron 21 cepas como referencia de *T. cruzi* (TcI) de ciclo silvestre y domestico que van desde los Estados Unidos a América del Sur para compararlas con las analizadas en la investigación.

Las presentes cepas TcI (ver Tabla 1) fueron aisladas de *T. infestans* silvestres y el uso de los ADNs fue otorgado por el grupo de investigadores franceses (MIVEGEC,

Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia). Las soluciones de ADN se encontraban almacenadas a -20°C con una concentración de $100\text{ ng}/\mu\text{l}$. Para poder iniciar el análisis los ADNs fueron resuspendidos con H_2O estéril a una concentración final de $20\text{ ng}/\mu\text{l}$.

En todas las muestras se verificó la calidad de ADN en una cámara electroforética que contenía el tampón de corrida TAE 0.5X (40 mM de Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8,3). A continuación se sometieron a electroforesis $10\ \mu\text{l}$ de cada muestra de ADN teñidos con el tampón de cargado EZ-Visión® (Amresco, USA), y cargados en cada pozo de un gel de agarosa de 1.5% para un volumen final de 40 ml de tampón TAE 1X. Se compararon los pesos moleculares de cada muestra utilizando una escala de peso molecular de 100 bp (DNA Ladder Plus, Euromedex, Francia).

Figura 8. Mapa de Bolivia: localización y distancias entre las 6 poblaciones de *T. cruzi* analizadas (Barnabe et al. 2013).

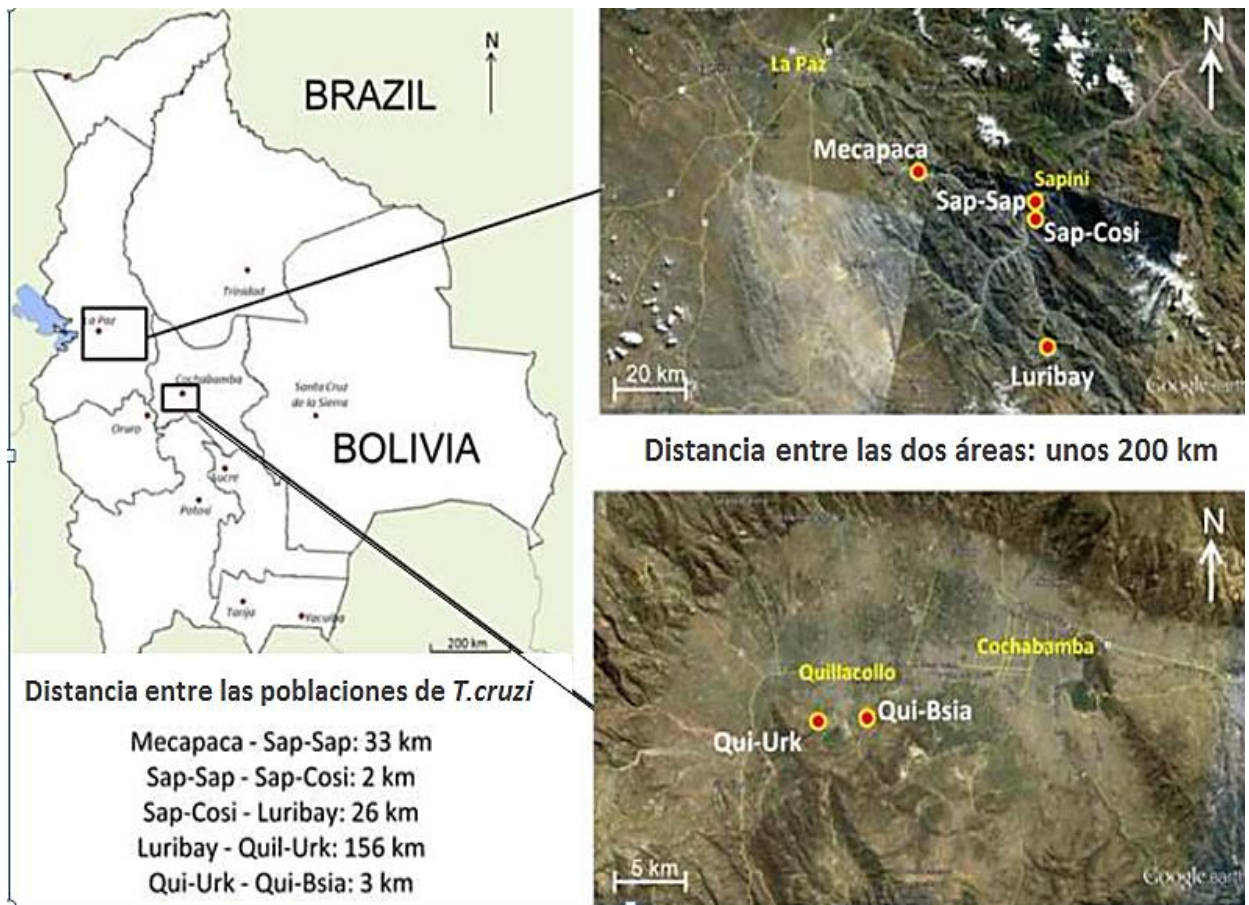


Tabla 1. Origen geográfico, huéspedes, DTU, ciclo y distribución en 6 poblaciones de las 116 cepas de *T. cruzi* utilizadas en el estudio

Código cepas	DTU*	País	Departamento	Provincia	Comunidad	Población	Huésped	Orden huésped	Ciclo**
LUR229 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
LUR237 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
LUR245 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
LUR250 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
LUR258 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
LUR265 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Luribay	Luribay	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC095 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC099 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC101 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC102 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC103 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC107 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC161 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC166 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC170 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC171 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
MEC173 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Murillo	Mecapaca	Mecapaca	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI755 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI757 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI762 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI763 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI766 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI768 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI769 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI774 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.

QUI775 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI907 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI913 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI916 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Urk	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI026 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Bsia	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI027 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Bsia	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI053 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Bsia	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
QUI054 ¹	TcI	Bolivia	Cochabamba	Quillacollo	Quillacollo 1° sección	Qui-Bsia	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP203 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP207 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP223 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP233 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP241 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP242 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP242bis ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP243 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP256 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP259 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP260 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP261 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP263 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP264 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP265 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP266 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP267 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP270 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP271 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP272 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.

SAP391 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP404 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP405 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP445 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP491 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP492 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Sap	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP500 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP302 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP303 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP304 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP310 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP310 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP312 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP313 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP318 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP319 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP321 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP323 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP334 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP336 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP337 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP346 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP347 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP348 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP349 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP372 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
SAP374 ¹	TcI	Bolivia	La Paz	Loayza	Sapahaqui	Sap-Cosi	<i>T. infestans</i> selvático	Hemiptera	S.
458 ²	TcI	Colombia	Valle	Sd	Bajo Calima	Referencia	<i>Potus flavus</i>	Carnívora	S.

361TA ²	TcI	Colombia	Nariño	Sd	Inguapi del Guadal	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
85/818 ²	TcI	Bolivia	Alto Beni	Sd	Albuquerque	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
93041401P ²	TcI	USA	Georgia	Sd	Statesboro Bulloch Co	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
93070103P ²	TcI	USA	Georgia	Sd	Fort Stewart Bryan Co.	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
A269 ²	TcI	Guiana	Sd	Sd	Cacao	Referencia	<i>Philander opossum</i>	Didelphimorphia	S.
CUICAc1 ²	TcI	Brasil	Sao Paulo	Sd	Riberao Preto	Referencia	<i>Philander opossum</i>	Didelphimorphia	S.
CUTIAc1 ²	TcI	Brasil	Espírito-Santo	Sd	Colatina	Referencia	<i>Dasyprocta aguti</i>	Rodentia	S.
Davis3 ²	TcI	Honduras	Sd	Sd	Tegucigalpa	Referencia	<i>Triatoma dimidiata</i>	Hemiptera	D.
FX18 ²	TcI	Colombia	Sucre	Sd	Galeras	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
G-38-01 ²	TcI	Brasil	Paraíba	Sd	Camalau	Referencia	<i>Didelphis albiventris</i>	Didelphimorphia	S.
H10 ²	TcI	México	Yucatán	Sd	Sd	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
OPS21c11 ²	TcI	Venezuela	Cojedes	Sd	Macuayas	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
P209c193 ²	TcI	Bolivia	Chuquisaca	Oropeza	Sucre	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
PB3c12 ²	TcI	Bolivia	La Paz	Sur Yungas	Palos Blanco	Referencia	<i>Rhodnius stali</i>	Hemiptera	S.
PERU ²	TcI	Perú	Sd	Sd	Sd	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
SABP3 ²	TcI	Perú	Sd	Sd	Vítor	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	D.
Saimiri4A ²	TcI	Venezuela	Sd	Sd	Sd	Referencia	<i>Saimiri sciureus</i>	Primates	S.
SP31 ²	TcI	Chile	Región IV	Sd	Flor del Valle	Referencia	<i>Triatoma spinolai</i>	Hemiptera	S.
V120 ²	TcI	Chile	Región II	Sd	San Pedro	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	D.
Z17 ²	TcI	México	Yucatán	Sd	Sd	Referencia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphimorphia	S.
IVV ³	TcII	Chile	Región IV	Sd	Cuncumen	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
CBB ³	TcII	Chile	Región IV	Sd	Tulahuen	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
TU18 ³	TcII	Bolivia	Potosí	Sur Chichas	Tupiza	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	sd
85/847 ³	TcIII	Bolivia	Alto Beni	Sd	Albuquerque	Referencia	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Cingulata	S.
M5631 ³	TcIII	Brasil	Sd	Sd	Selva Terra Island of Marajo	Referencia	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Cingulata	S.
CM17 ³	TcIII	Colombia	Meta	Sd	Carimaga	Referencia	<i>Dasypus sp.</i>	Cingulata	S.
STC10R ³	TcIV	USA	Georgia	Sd	St. Catherines Island Liberty	Referencia	<i>Procyon lotor</i>	Carnívora	S.
10R26 ³	TcIV	Bolivia	Sd	Sd	Santa Cruz	Referencia	<i>Aotus sp.</i>	Primates	S.

Bug2148 ³	TcV	Brasil	Sd	Sd	Rio Grande do Sul	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	D.
92.80 ³	TcV	Bolivia	Sd	Sd	Santa Cruz	Referencia	<i>Homo sapiens</i>	Primates	D.
SC43 ³	TcV	Bolivia	Chuquisaca	Andrés Ibáñez	Santa Cruz	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	sd
VFRA1 ³	TcVI	Chile	Región I	Sd	Francia	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	D.
Guateque ³	TcVI	Sd	Sd	Sd	Sd	Referencia	sd	sd	sd
Tulahuen ³	TcVI	Chile	Región IV	Nk	Tulahuen	Referencia	<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera	D.
B7 ⁴	Tcm ⁴	Brasil	Bahía	Sd	Sao Felipe	Referencia	<i>Phyllostomus discolor</i>	Chiroptera	S.

¹Las 6 poblaciones nacionales en estudio de *T. cruzi* I; ²Cepas de referencia *T. cruzi* I; ³Cepas de referencia *T. cruzi* II, III, IV, V y VI; ⁴*T. c. marinkellei* *DTU= Discrete Typing Unit (unidad discreta de tipificación); **D.= domestico, S.= selvático, sd = sin datos

3.3. Amplificación por PCR de los fragmentos de los genes seleccionados

Se analizaron las secuencias de 5 genes nucleares: Glucosa-6-fosfato isomerasa (*GPI*), Glutation peroxidasa (*GPX*), Leucina amino peptidasa (*LAP*), GTP-proteína de unión a Rab7 (*GTP*) y Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad α (*PDH*) y de 2 genes mitocondriales: Citocromo *c* oxidasa subunidad 2 (*COII*) y Citocromo b (*CYTB*). La elección de los genes se realizó según datos previos (ver Tabla 2) y por recomendación del equipo de cooperación francesa IRD. En cuanto al diseño de los cebadores se utilizó el sitio NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los diferentes genes se describen a continuación.

Tabla 2: Secuencias de cebadores, tamaño de fragmentos y localización

Genes nucleares	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño	Ubicación cromosoma	Referencia
<i>GPX</i>	L	CGTGGCACTCTCCAATTACA	360	35	Lauthier <i>et al</i> 2012
	R	AATTTAACCAGCGGGATGC			
<i>PDH</i>	L	GGGGCAAGTGTGTTGAAGCTA	491	40	Lauthier <i>et al</i> 2012
	R	AGAGCTCGCTTCGAGGTGTA			
<i>GTP</i>	L	TGTGACGGGACATTTTACGA	561	12	Lauthier <i>et al</i> 2012
	R	CCCCTCGATCTCACGATTTA			
<i>GPI</i>	L	CGCCATGTTGTGAATATTGG	405	6	Lauthier <i>et al</i> 2012
	R	GGCGGACCACAATGAGTATC			
<i>LAP</i>	L	TGTACATGTTGCTTGGCTGAG	420	27	Lauthier <i>et al</i> 2012
	R	GCTGAGGTGATTAGCGACAAA			
Genes mitocondriales	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño	Ubicación genoma Mitocondrial Cepa Silvio X10/1	Referencia
<i>CYTB</i>	L	AGCGGAGAAAAGAGGAAGGGTCT	831	4126–4733	Messenger <i>et al</i> 2012
	R	TCAGGCACTGCTTTAAAGGAAACC			
<i>COII</i>	L	AGCTGGCCCGACTCTAAGTTGT	727	8194–8610	Messenger <i>et al</i> 2012
	R	CCCCACATAACTCGTACATTGCC			

Los cebadores correspondientes fueron sintetizados por la compañía Eurofins Genomics, Alemania. Las reacciones de PCR fueron las mismas para todos los locus correspondientes. Estos fueron conducidos en un volumen final de 50 μ l de la mezcla de la reacción, que contenía: 5 μ l de buffer 10 X (tampón de reacción), 0.5 μ l de dNTPs (Roche Diagnostics, Alemania), a concentración de 5 mM, 0.2 μ l de *Taq* polimerasa (Roche Diagnostics, Alemania), 1 μ l de cada cebador “Forward” y “Reverse”, 40.3 μ l de H₂O tridestilada, y 2 μ l de ADN de cada muestra. La amplificación se realizó en un termociclador *Amplitrionyx 6 termal cycler* de la marca Nyxtechnik (USA).

La PCR inició con una etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de tres pasos: el primero de desnaturalización del ADN 30 segundos a 94°C, el segundo de hibridación de las cadenas desnaturalizadas con los cebadores a 55°C y el tercero de elongación a 72°C por 30 segundos, finalmente la elongación final de síntesis de las cadenas de ADN complementarias para completar la extensión de las cadenas amplificadas a 72°C durante 5 minutos, terminando a 4°C durante 10 minutos.

Se diluyeron 10 μ l de los productos resultantes de PCR de cada muestra en un tampón de migración EZ-Visión® (Amresco, USA), seguidamente sembrados en geles de agarosa al 1.5 %. Para confirmar la presencia de amplicones y el tamaño de los productos, se empleó en la corrida electroforética el marcador de peso molecular de 100 pb.

El secuenciamiento del ADN se realizó en la Universidad de Montpellier (Francia), donde se envió para cada muestra un volumen de amplicón de 10 μ l en placas especiales previamente etiquetadas con el código de la muestra, además se adjuntaron al envío, los cebadores específicos (forward y reverse) a una concentración de 10 μ M con un volumen de 2 μ l por muestra.

3.4. Análisis y correcciones de las secuencias e identificación de los haplotipos

La información de la secuenciación se recibió en ficheros electrónicos en formato de cromatograma con la extensión “.ab1”, dos secuencias una “Forward (F)” y una “Reverse (R)”, correspondientes a las secuencias encontradas para cada hebra del fragmento de ADN. Estas fueron inspeccionadas pico por pico usando el programa Chromas versión 2.0 (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), eliminando al inicio y al final nucleótidos de aquellas secuencias que presentaban picos dudosos o poco amplificadas. A partir de estas, se identificaron nucleótidos con incertidumbres (heterocigotos) identificados por la presencia de dos picos coincidentes en el mismo locus, verificadas en las secuencias *forward* y *reverse* en los cuales se utilizó el código de una letra para representar a estos, propuesto por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) esta nomenclatura fue usada para designar cada sitio (Cornish-Bowden 1985). Las secuencias obtenidas para cada locus fueron alineadas utilizando el software Seaview v.4.3.3 (Galtier, Gouy et al. 1996), además se crearon un grupo de secuencias de consenso con el propósito de formar un patrón de ambas secuencias tanto de Forward como Reverse. Los sitios nucleotídicos donde se identificaron ambigüedades se resolvieron justamente con esta secuencia. Para las secuencias cuyos cromatogramas mostraron picos escasamente definidos o ilegibles se repitieron los amplificados de PCR.

Se organizaron todas las secuencias “consenso” en formato “fasta”, a continuación se cortaron los fragmentos no resueltos en sentido 5’ a 3’ al final se obtuvieron secuencias editadas, corregidas y alineadas para una misma región de cada gen, mediante el programa MEGA v.5.05 (Tamura, Peterson et al. 2011). A partir de estas se generaron los haplotipos más probables para cada gen en base al set de datos total utilizando el programa DnaSP (*DNA Sequence Polymorphism*) v.5.10.01 (Librado & Rozas 2009).

Para poder estudiar las relaciones filogenéticas existentes en nuestras cepas y compararlas con cepas de referencia, añadimos a las secuencias de los genes mitocondriales secuencias de referencia de los DTUs TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y del *outgroup* *T. c. marinkellei*. Para obtener esas secuencias en el banco de datos GenBank®, hemos usado el algoritmo BLAST del portal bioinformático NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Cabe resaltar que no se añadieron secuencias de referencia a los genes nucleares porque para estudios filogenéticos únicamente se usan marcadores no recombinantes, es decir, libres de intercambios genéticos, que no es teóricamente el caso de las cepas estudiadas. Los códigos de las secuencias de referencia se muestran a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Código de cepas de referencia en GenBank® de *T. cruzi* perteneciendo a las DTUs TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y como out group *Trypanosoma cruzi marinkellei*, utilizadas en la construcción del árbol y la red filogenética

	<i>COII</i>		<i>CYTB</i>	
	Cepa	Código	Cepa	Código
TcII	CBB	312434825	CBB	21998690
	IVV	312434828	TU18	19744030
TcIII	85/847	312434837	M5631	21998686
	M5631	312434836	CM17	384875112
TcIV	STC10R	284156861	10R26	384875109
	10R26	312434868	STC10R	224581772
TcV	Bug2148	31243484	92.80	21998696
	92-80	312434840	SC43	21998688
TcVI	VFRA1	312434846	Guateque	21998694
			Tulahuen	19744038
T.c.m ¹	B7	21702399	B7	452089893

¹*Trypanosoma cruzi marinkellei*

3.5. Estudio de la diversidad genética de las cepas bolivianas

A partir de las secuencias corregidas, alineadas y cortadas fueron analizadas todas las muestras de los diferentes genes nucleares y mitocondriales para las 6 poblaciones de nuestro set de datos (no se tomaron en cuenta las secuencias de referencia), con el software DNAsp, se estimó los sitios polimórficos, número de haplotipos, además índices de diversidad que miden la variación de secuencias dentro y entre poblaciones:

Diversidad nucleotídica (P_i), que corresponde al número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei & Li 1979), utilizada para medir el grado de polimorfismo dentro la población.

Diversidad haplotípica (H_d). Es una medida de la singularidad de cada haplotipo en una población determinada. Se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados uniformemente al azar de una población sean diferentes (Saitou & Nei 1987), es otra medida de polimorfismo dentro de una población.

Heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) estimados con el programa GENETIX versión 4.05 (Belkhir, Borsa et al. 1996).

Número de alelos por locus y población, riqueza alélica ($Riq.all$), está calculada a partir del número de alelos y puede definirse como el número de alelos esperado en la población independientes de tamaño de la muestra.

Diversidad genética que es una medida del grado de variación génica en una población se calculó con el software FSTAT (Goudet 1995).

3.6. Análisis de panmixia dentro las poblaciones en estudio

Para la mayoría de los patógenos, incluida la familia Trypanosomatidae, la estrategia reproductiva se deduce principalmente del análisis de la genética de poblaciones (Rougeron, De Meeus et al. 2010).

Los análisis para este tipo de estudios se centraran generalmente en tipos de eventos involucrados en intercambios sexuales y se han propuesto varios criterios para poner a prueba este concepto por ejemplo: desviación de las expectativas Hardy-Weinberg (*Fis*) y desequilibrio de ligamiento (LD) (Rougeron, De Meeus et al. 2010). Un estudio previo, basado en simulaciones y con el objetivo de estimar el nivel de reproducción clonal en diploides (de Meeus & Balloux 2004) aconseja el uso simultáneo de *Fis* (media y varianza) y estimadores de LD.

El índice *Fis* es una medida de la endogamia de los individuos dentro de una sub-muestra; mide el déficit o exceso del heterocigotos, también representa la desviación de la unión al azar de los gametos y varía de -1 (heterocigocidad fija) a 1 (homocigocidad fija) donde un *Fis* = 0 representa equilibrio de Hardy-Weinberg (Wright 1965). Los valores negativos de *Fis* (exceso de heterocigocidad) pueden ser causados por la acumulación de mutaciones en un antiguo linaje clonal, un fenómeno llamado el efecto Meselson (Judson & Normark 1996), que entonces, se considera generalmente como un marcador de clonalidad (Mark Welch & Meselson 2000). Los valores positivos de *Fis* corresponden a la endogamia dentro de la muestra, un caso particular puede ser el efecto Wahlund, cuando la muestra proviene de poblaciones estructuradas y heterogéneas. Todos los tests estadísticos se basan en asignaciones al azar: sets de datos ajustados a hipótesis nula (H_0 = panmixia) fueron generados por la aleatorización correspondientes a la unidad (alelo, genotipo, etc.). Aquí, para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) dentro de las sub-muestras, los alelos se permutaron entre individuos dentro de cada sub-muestra y se utiliza el *Fis* como un estimador de HWE. Se probó después de 6000 permutaciones aleatorias de los alelos entre los individuos dentro las poblaciones. El intervalo de confianza de los valores de *Fis* por muestra fue al 95% estimado por bootstrap sobre los locus.

Otra medida de la desviación de panmixia es el desequilibrio de ligamiento (LD), es la asociación no aleatoria de los genotipos en diferentes loci. El significado de un LD

significativo se toma como evidencia circunstancial de que se han producido obstáculos para que existan intercambios genéticos aleatorios en las muestras en estudio (Tibayrenc, Kjellberg et al. 1990).

Para analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg (*Fis*) y el desequilibrio de ligamiento, se examinaron los 5 genes nucleares de las seis poblaciones en estudio (Luribay, Mecapaca, Sap-Sap, Sap-Cosi, Qui-Urk, y Qui-Bsia). Con el programa DNAsp se generaron las frecuencias haplotípicas de todos los genes y se organizaron en un fichero Excel a continuación con el programa Genetix versión 4.05 se organizaron los datos para poder procesarlos y analizarlos con el programa FSTAT (Goudet J, 1995) y el programa ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

3.7. Análisis de la estructuración genética entre las poblaciones

Para poder observar la estructura entre grupos de poblaciones y la diferenciación entre estas se realizó el cálculo del F-estadístico (Scharfstein, Andrade et al.2013), Análisis Molecular de Varianza (Abramova, Burakova et al.1979), procesados con el programa Arlequín 3.1 (Excoffier & Heckel 2006) y el programa Populations 1.2.30 (Langella, 1999).

Las seis poblaciones fueron analizadas realizando tres tipos de cálculos:

- Diferenciación entre pares de poblaciones *Fst*, es un índice de similitudes (aparentado a distancia genética) entre pares de poblaciones. Los valores de *Fst* calculados entre pares de poblaciones fueron probados bajo la hipótesis de ausencia de diferencias entre las poblaciones usando 1000 permutaciones de haplotipos entre las poblaciones.
- Análisis molecular de la varianza (Abramova, Burakova et al. 1979); para analizar la estructura de las poblaciones, mediante los porcentajes respectivos de las variaciones intra población, entre poblaciones de un mismo grupo e inter grupos. Se han definido dos tipos de análisis genéticos de poblaciones a ser

probadas: La primera comprende un análisis global (un solo grupo) para observar si existen diferencias en las poblaciones, para la segunda se hicieron dos grupos de poblaciones, el primero comprende el grupo de poblaciones del departamento de La Paz (Luribay Mecapaca y dos poblaciones de Sapini) y el segundo grupo poblaciones de Cochabamba (Quillacollo (Qui-Urk y Qui-Bsia) para observar las diferencias entre los grupos y al interior de los grupos.

- Construcción de árboles inter-poblaciones para observar los agrupamiento de las seis poblaciones utilizando el software Populations v1.2.30 (Langella, 1999).

3.8. Estudios filogenéticos con los genes mitocondriales

A la diferencia del estudio de la variabilidad genética y estructuración de las poblaciones, para este tipo de estudios consideramos solamente los genes mitocondriales por el hecho que para los análisis filogenéticos se usa marcadores no recombinantes. En este sentido a partir del total de los haplotipos obtenidos con el programa DNAsp, que incluía tanto las secuencias estudiadas y las secuencias de referencia para cada gen, fueron sometidas a un análisis filogenético molecular, utilizando el programa MEGA v4.0 (Kumar, Tamura et al. 2004). Se eligió para cada gen un modelo de sustitución óptimo (cualquiera sea el método de construcción filogenética es preciso determinar el modelo de sustitución múltiple más adaptado al set de datos). Para la construcción del árbol se utilizó el método estadístico de máximo de verosimilitud (*Maximum Likelihood*) (Felsenstein, 1981), la confiabilidad de los nodos de los árboles se evaluó por bootstrap (Felsenstein, 1985) de 10000 repeticiones, los demás parámetros fueron elegidos por defecto con el fin de obtener resultados orientativos sobre las secuencias y evaluar así sus agrupaciones.

Las relaciones filogenéticas fueron reconstruidas entre los haplotipos utilizando el programa Network v4.6 (Bandelt, Forster et al. 1999), disponible en <http://www.fluxus-engineering.com> con el algoritmo *Median-Joining* que permite el análisis de datos multi-estado. De hecho hemos elegido el enfoque de red en lugar de los

métodos filogenéticos convencionales por recomendación previa para análisis de filogenia intraespecífica (Posada & Crandall 2001). Con las siguientes opciones: sin pre-processing, ϵ igual a 0, standard *post-processing* y los demás parámetros por defecto. Así mismo en la construcción de redes se marcaron con diferentes colores tanto las DTUs como las poblaciones en estudio (estas incluían las secuencias estudiadas y secuencias de referencia de cada gen).

4. RESULTADOS

4.1. Alineamiento de las secuencias para cada gen

Los fragmentos genéticos fueron amplificados de todas las cepas con éxito a través de PCR, usando condiciones idénticas de amplificación. En todos los casos se obtuvo únicamente una banda correspondiente al tamaño esperado como es ilustrado en la Figura 9 para tres de los genes.

Ciento tres cepas de *T. cruzi* (TcI) silvestres fueron exploradas, y posteriormente a su secuenciación se obtuvieron las secuencias de 93 cepas para el gen Glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*), 96 para la Glutation peroxidasa (*GPX*), 90 para la Leucina amino peptidasa (*LAP*), 93 para la GTP-proteína de unión a Rab7 (*GTP*), 78 para la Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad α (*PDH*) y para los genes mitocondriales 86 para la Citocromo *c* oxidasa subunidad 2 (*COII*) y 83 para el Citocromo b (*CYTB*).

Todas las secuencias para los respectivos genes, fueron identificadas por alineamiento con secuencias depositadas en *GenBank*. En base al alineamiento de todas las secuencias para cada gen se identificaron: 6 haplotipos para *GPI*, 7 haplotipos para *GPX*, 9 haplotipos para *GTP*, 6 haplotipos para *LAP*, 9 haplotipos para *PDH*, 20 haplotipos para *COII* y 10 haplotipos para *CYTB*. Para todos los genes se observaron incertidumbres entre dos nucleótidos (Figura 10) en el caso de los genes nucleares por el hecho de ser un genoma diploide, se consideró para cada cepa dos haplotipos correspondientes a los dos alelos y, para los genes mitocondriales estos con genoma haploide, se tomó en cuenta cada secuencia como corresponde teóricamente a un haplotipo sin ambigüedades.

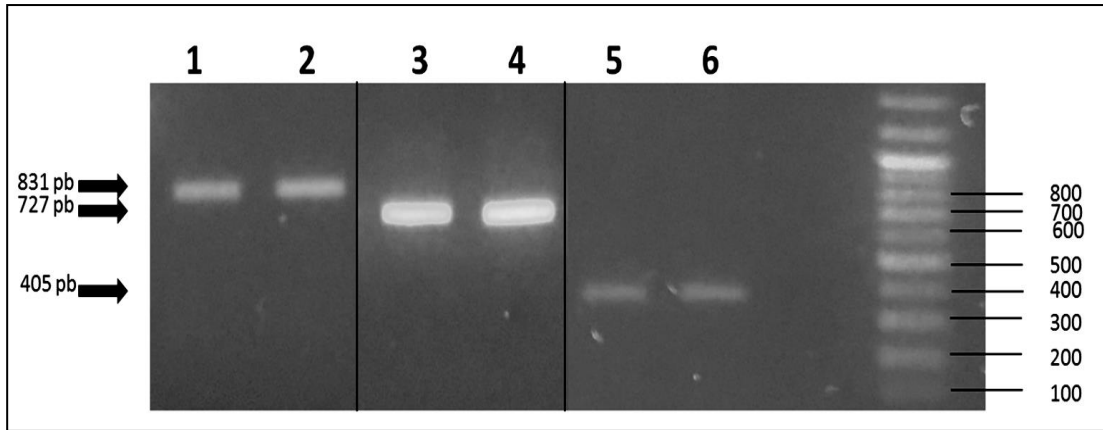


Figura 9. Amplificación de los fragmentos de ADN (PCR), se observa en los pozos 1-2 amplificados del gen *CYTB*, pozos 3-4 amplificados del gen *COII*, pozos 5-6 amplificados del gen nuclear *GPI*, el ultimo pozo corresponde al marcador molecular de 100 pb

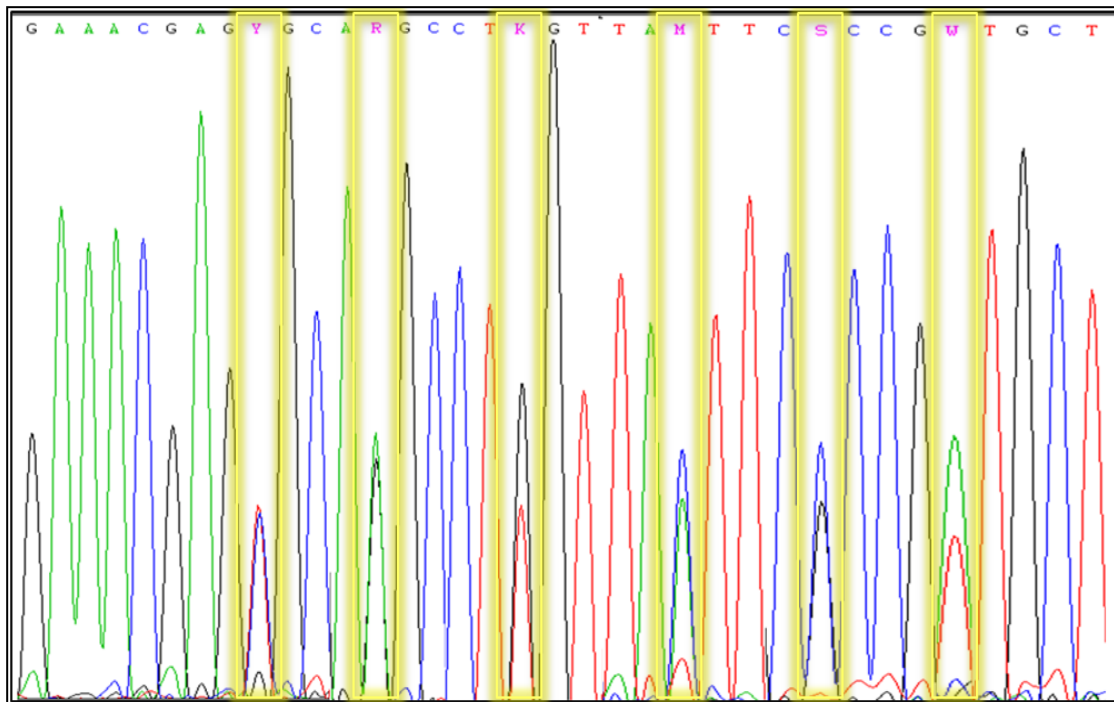


Figura 10. Lectura de la secuencia de ADN (cromatograma), correspondiente a los genes *GPX* (Y,R), *LAP* (K,M,S) y *COII* (W), se observan dobles picos (incertidumbres entre dos nucleótidos) que según el Sistema de notación internacional IUPAC corresponden a: (Y) = C o T, (R) = A o G, (K) = G o T, (M) = A o C, (S) = G o C, (W) = A o T.

4.2. Incertidumbres en los genes nucleares

Se observaron incertidumbres en los 5 genes nucleares en diferente proporción para las seis poblaciones en estudio y, para algunas cepas de referencia en diferentes sitios, como se observa a continuación en la Tabla 4. Para cada secuencia que presentó incertidumbres, el programa DNAsp generó dos haplotipos correspondientes a cada alelo. Se consideró, en el caso de todas las secuencias nucleares para cada cepa dos secuencias, análogas en caso de homocigotos y diferentes para los heterocigotos.

Tabla 4. Incertidumbres en los genes nucleares

	Código de cepas	Población	Sitio nucleotídico	Incertidumbre	
<i>G</i>	QUI916, QUI913, QUI907, QUI775, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755	Qui-Urk	213	Y	
			469	Y	
	QUI026, QUI027, QUI053, QUI054	Qui-Bsia	213	Y	
			469	Y	
	458	Referencia	213	Y	
			405	Y	
	<i>P</i>	A269	Referencia	480	R
				213	Y
	<i>I</i>	CUICAc11, SABP3	Referencia	469	Y
				469	Y
	CUTIAc11, PB3c12	Referencia	469	Y	
	G-38-01	Referencia	213	Y	
			64	Y	
	<i>LUR229, LUR237</i>	<i>Luribay</i>	200	R	
			221	K	
			242	Y	
	MEC099, MEC101, MEC102, MEC170	Mecapaca	139	R	
	QUI916, QUI913, QUI907, QUI775, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755	Qui-Urk	139	R	
	QUI026, QUI027, QUI053, QUI054	Qui-Bsia	139	R	
<i>G</i>	SAP207	Sap-Sap	65	Y	
			200	R	
			221	K	
			242	Y	
<i>P</i>	SAP271	Sap-Sap	197	K	
<i>X</i>	SAP303, SAP304, SAP310	Sap-Cosi	197	K	
	SAP318, SAP336, SAP347, SAP349	Sap-Cosi	65	Y	
			200	R	
			221	K	
			242	Y	
	SAP372	Sap-Cosi	197	K	
			200	R	

			242	Y
	85/818, PB3cl2	Referencia	65 221	Y K
	93041401P, 93070103P, Davis3, H10, OPS21cl11, PERU	Referencia	242	Y
	SABP3	Referencia	139	R
	MEC103, MEC107, MEC161, MEC166, MEC171	Mecapaca	150	M
	MEC173	Mecapaca	150	M
<i>L</i>	361TA	Referencia	314	S
<i>A</i>	85/818		37	R
<i>P</i>		Referencia	277	K
	93070103P, OPS21cl11	Referencia	250	M
	PB3cl2,Saimiri4A	Referencia	277	K
	LUR258	Luribay	193 208	Y Y
	MEC095	Mecapaca	208	Y
	MEC103, MEC107, MEC161, MEC166	Mecapaca	193 208	Y Y
<i>P</i>	QUI916, QUI913, QUI907, QUI775, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755	Qui-Urk	106 193	Y Y
<i>D</i>	QUI026, QUI027, QUI053, QUI054	Qui-Bsia	106 193	Y Y
<i>H</i>	SAP207, SAP 271, SAP445, SAP265	Sap-Sap	193 208	Y Y
	SAP264	Sap-Sap	208	Y
	SAP302, SAP321, SAP334, SAP337, SAP346, SAP374	Sap-Cosi	193 208	Y Y
	85/818	Referencia	208	Y
	LUR229, LUR258	Luribay	286 355 406	K R Y
	LUR237	Luribay	286	K
	QUI916, QUI913, QUI907, QUI775, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755	Qui-Urk	286 355 406	K R Y
<i>G</i>	QUI027, QUI053	Qui-Bsia	286 355 406	K R Y
<i>T</i>	SAP492, SAP491, SAP445, SAP404, SAP272, SAP270, SAP267,		286	K
<i>P</i>	SAP265, SAP264, SAP263, SAP261, SAP260, SAP259, SAP256, SAP242bis, SAP242, SAP241, SAP233, SAP223, SAP203	Sap-Sap	355 406	R Y
	SAP266	Sap-Sap	286	K
	SAP500	Sap-Cosi	286 355 406	K R Y
	SAP372	Sap-Cosi	286 355	K R
	458	Referencia	124 325	M R

361TA	Referencia	124	M
		286	K
93041401P, 93070103P, PERU	Referencia	406	Y
		286	K
CUICAc1, SABP3	Referencia	355	R
		406	Y
FX18	Referencia	124	M
		406	Y
G-38-01	Referencia	303	Y
PB3c12, Saimiri4A	Referencia	124	M
		286	K
		355	R
		406	Y

4.2.1. Heterocigotos en el gen nuclear *GPI*

En las secuencias correspondientes al gen *GPI* se obtuvo una longitud de la región de 482 pb, se observaron 23 cepas con sitios heterocigotos, de las cuales presentaron entre uno y dos sitios con incertidumbres en sus secuencias, solo dos poblaciones y algunas cepas de referencia mostraron incertidumbres en diferentes sitios, en las cuales se evidenció unos **Y** y solo una cepa de referencia con **R**.

4.2.2. Heterocigotos en el gen nuclear *GPX*

Para el siguiente gen *GPX* se obtuvo una longitud de la región de 274 pb, mostrando un total de 41 cepas con sitios heterocigotos, de las cuales presentaron hasta cuatro sitios con incertidumbres en las secuencias en diferente proporción: 7 cepas de las poblaciones de Luribay, Sap-Sap y Sap-Cosi mostraron en cuatro sitios **Y, R, K, Y**; 1 cepa de Sap-Cosi con tres sitios **K, R, Y**; 20 cepas de Mecapaca, Qui-Urk y Qui-Bsia con un sitio **R**; 4 cepas de Sap-Sap y Sap-Cosi con un sitio **K**; para cepas de referencia: 2 cepas con dos sitios **Y, K**; y 7 cepas con un sitio **Y (R)**.

4.2.3. Heterocigotos en el gen nuclear *LAP*

En el caso del gen *LAP* se obtuvo una longitud de 356 pb, en este gen se observó la menor cantidad de secuencias con sitios heterocigotos en relación a los demás genes con solo 12 cepas (solo una población y algunas cepas de referencia con incertidumbres). Para Mecapaca 5 cepas con un sitio **M** y 1 cepa con un sitio **N**; para cepas de referencia: 4 cepas con un sitio **M (K)** y 1 cepa con dos sitios **R, K**.

4.2.4. Heterocigotos en el gen nuclear *PDH*

Para el gen *PDH* se obtuvo una longitud de 462 pb, en este gen se observó un total de 34 cepas de las seis poblaciones y una cepa de referencia con sitios heterocigotos, presentaron solamente la incertidumbre **Y** entre uno y dos sitios en sus secuencias.

4.2.5. Heterocigotos en el gen nuclear *GTP*

Para el siguiente gen *GTP* se obtuvo una longitud de la región de 523 pb, en este gen se observó la mayor cantidad de secuencias con sitios heterocigotos en relación a los demás genes con 51 incertidumbres en las secuencias en diferente proporción: 37 cepas de Luribay, Qui-Urk, Qui-Bsia, Sap-Sap y Sap-Cosi con tres sitios **K, R, Y**; 1 cepa de Sap-Cosi con dos sitios **K, R** y 2 cepas de Luribay y Sap-Sap con un sitio **K**; para las cepas de referencia: 2 cepas con cuatro sitios **M, K, R, Y**; 2 cepas con tres sitios **K, R, Y**; 3 cepas con dos sitios **M, R (K) (Y)**; y 4 cepas con un sitio **Y**.

4.3. Incertidumbres en los genes mitocondriales

En nueve cepas se observaron incertidumbres para algunos sitios de dos genes mitocondriales presentadas en la Tabla 5. Para estos genes se tomó en cuenta, para las cepas sin incertidumbre un haplotipo y en caso de cepas con incertidumbre dos haplotipos. No se evidenció incertidumbres en cepas de referencia.

Tabla 5. Incertidumbres en los genes mitocondriales

Código de cepas	Población	Sitio nucleotídico	Incertidumbre	
SAP310	Sap-Cosi	85	W	
SAP336, SAP334	Sap-Cosi	391	R	
<i>COII</i>	SAP303	391	R	
		436	Y	
SAP265	Sap-Sap	436	Y	
<i>CYTB</i>	SAP303, SAP334, SAP336, SAP374	Sap-Cosi	444	R

Para el gen *COII* se obtuvo una longitud de 483 pb, se observó ambigüedades en 5 secuencias: SAP310, SAP336, SAP334, SAP265 en un sitio nucleotídico con W (R) (Y); y SAP303 en dos sitios con R y Y. Se generaron 2 haplotipos para cada secuencia que presentaban estas ambigüedades.

Para el gen *CYTB* se obtuvo una longitud de 721 pb, se observó ambigüedades en 4 secuencias: SAP303, SAP334, SAP336 y SAP374 con incertidumbres para las cuatro, en el nucleótido 444 presentando una R

4.4. Diversidad genética de las secuencias de las seis poblaciones para los 4 genes nucleares y los 2 genes mitocondriales.

En cada gen, se realizaron análisis de variabilidad para las secuencias de las seis poblaciones (no se incluyeron las cepas de referencia). La Tabla 6 resume los índices de variabilidad para todos los genes: número de haplotipos, número de sitios polimórficos, diversidad nucleotídica (P_i) y la diversidad haplotípica (H_d).

La diversidad nucleotídica (P_i) se observa más elevada en el gen *GPX* este el más variable a nivel nucleotídico en comparación con los demás genes, mientras que la más baja fue observada en el gen *LAP*. La diversidad haplotípica muestra los valores más altos en el gen mitocondrial *COII* que se evidencia al comparar con el número de haplotipos observado y la más baja en el gen nuclear *LAP*. Para todos los genes no se observaron sitios gap.

Tabla 6. Índices de variabilidad de seis genes para cepas TcI silvestres

	Genes						
	Mitocondriales		Genes Nucleares				
	<i>CYTB</i>	<i>COII</i>	<i>GPI</i>	<i>GPX</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
Número de sitios nucleotídicos	721	483	482	274	356	523	462
Número de cepas estudiadas	65	64	76	79	71	73	73
Número de sitios con incertidumbres	1	3	2	6	1	3	3
Número de cepas con incertidumbres	4	5	16	15	8	39	33
Número de secuencias para analizar diversidad*	69 ^a	69 ^a	152 ^b	158 ^b	142 ^b	146 ^b	146 ^b
Número de haplotipos	3	9	2	5	2	4	7
Número de sitios polimórficos	2	17	3	6	1	3	5
Diversidad nucleotídica	0,00064	0,00305	0,00079	0,0081	0,00027	0,00286	0,0023
Diversidad haplotípica	0,450	0,736	0,190	0,595	0,094	0,512	0,563

*(a)=genes mitocondriales, para las cepas sin incertidumbre se consideró 1 haplotipos y para las cepas con incertidumbre 2 haplotipos (b)=genes nucleares, para todas las cepas con o sin incertidumbre se consideró 2 haplotipos

4.5. Análisis de diversidad genética

Los análisis de diversidad y recombinación se exploraron dentro las seis poblaciones locales de *T. cruzi* TcI (79 cepas). Detalles sobre el origen y composición de los genotipos de cada cepa estudiada para los 5 genes nucleares se muestran en el Anexo 1.

Se obtuvieron un total de 395 genotipos pertenecientes a las seis poblaciones potencialmente panmícticas, 23 mostraron ausencia de producto PCR (no amplificaron) representando un 5,8% del total.

Los principales índices de diversidad genética, así como heterocigotos observados y esperados, *Fis* y *valor-P* (es a decir el riesgo de rechazar por error la hipótesis nula de panmixia) para cada población de cada locus se enumeran en la Tabla 7.

El número de alelos tuvo una variación entre 1 a 5, observando monomorfismo en 3 genes para algunas poblaciones (4 poblaciones en *GPI*, 5 poblaciones en *LAP*, y en 1 población en *GTP*). La población de Sap-Sap es la que presenta mayor variabilidad en función del número de alelos, en comparación con la población de Luribay que presentó el número más bajo. Del mismo modo la diversidad genética y la riqueza mostraron los valores más elevados en las poblaciones de Qui-Bsia y Qui-Urk con respecto a las demás poblaciones, observando los valores más bajos en Sap-Cosi.

Con respecto a los valores de heterocigocidad observada (*Ho*) todas las poblaciones tuvieron una variación entre 0,07-1,00, mostrando en Qui-Urk y Qui-Bsia en todos los locus un valor fijo de $Ho=1,0$, entre tanto para Luribay, Mecapaca, Sap-Sap y Sap-Cosi *Ho* en promedio fue 1,36. En el caso de la heterocigocidad esperada (*He*) la media de los resultados para las poblaciones de Luribay, Mecapaca, Sap-Sap y Sap-Cosi fue 0,35, en contraste Qui-Urk y Qui-Bsia $He = 0,5$. En cada población se pudo observar diferencias variables entre *Ho* y *He* pero las diferencias más sobresalientes se muestran para las poblaciones de Qui-Urk y Qui-Bsia ($Ho = 1,0$; $He = 0,5$), estas diferencias corresponden a un déficit de homocigotos que se presenta en todos los *genes* dentro de cada muestra.

4.6. Análisis de desequilibrio de Hardy-Weinberg

Los valores estimados del coeficiente de endogamia F_{is} (Tabla 7) con un intervalo de confianza de 95%, mostraron los siguientes resultados:

Analizando los valores F_{is} sobre las poblaciones muestran que en Qui-Urk y Qui-Bsia existe una notoria “heterocigosidad fijada” (F_{is} de -1,00), en contraste las otras poblaciones muestran valores que van entre -0,57 a 0,64 observando para algunas poblaciones exceso de heterocigotos (Mecapaca) y para otras déficit de heterocigotos (Luribay).

Por otra parte considerando todos los locus la mayoría de los valores muestra un exceso de heterocigotos general (en total 14 de 20 valores negativos de F_{is}). Sin embargo para poder comprobar si estos valores de F_{is} fueron estadísticamente significativos, y así poder rechazar o no la panmixia, consideramos el *valor-P* que comprobó que: en 3 de 5 locus de la población de Qui-Urk y en 1 locus sobre 5 de la población de Sap-Sap, se desvían significativamente del equilibrio de HWE. Considerando los promedios de valores de F_{is} por locus, Qui-Urk es la única población donde se puede rechazar la hipótesis nula de panmixia, en las otras poblaciones, no se puede rechazar H_0 .

Tabla 7. Principales índices de diversidad genética, análisis de F_{is} y *valor-P* por locus (horizontal) y por población (vertical) de las poblaciones de *T. cruzi* TcI aisladas de seis poblaciones estudiadas.

Locus	Poblaciones					
	Luribay	Mecapaca	Qui-Urk	Qui-Bsia	Sap-Sap	Sap-Cosi
N	6	11	12	4	27	19
N^{all}	2	2	2	2	3	4
$riq.all$	1,857	1,582	1,907	1,971	1,148	1,767
$div.g$	0,5	0,309	0,5	0,5	0,073	0,368
GP H_0	0,330	0,36	1,0	1,0	0,07	0,36
He	0,48	0,31	0,52	0,57	0,07	0,36
F_{is}	0,33	-0,18	-1,00	-1,00	-0,01	0,00
$Val-P$	0,98	0,67	0,00*	0,22	0,97	0,72

	<i>N</i>	6	11	12	4	25	18	
	<i>N°all</i>	1	1	2	2	1	1	
	<i>riq.all</i>	1,000	1,000	1,907	1,971	1,000	1,000	
<i>GPI</i>	<i>div.g</i>	0	0	0,5	0,5	0	0	
	<i>Ho</i>	Mo	Mo	1,0	1,0	Mo	Mo	
	<i>He</i>	Mo	Mo	0,52	0,57	Mo	Mo	
	<i>Fis</i>	Mo	Mo	-1,00	-1,00	Mo	Mo	
	<i>Val-P</i>	Mo	Mo	0,007	0,21	Mo	Mo	
	<i>N</i>	3	11	12	4	25	16	
	<i>N°all</i>	1	2	1	1	1	1	
	<i>riq.all</i>	1,000	1,809	1,000	1,000	1,000	1,000	
<i>LAP</i>	<i>div.g</i>	0	0,445	0	0	0	0	
	<i>Ho</i>	Mo	0,63	Mo	Mo	Mo	Mo	
	<i>He</i>	Mo	0,45	Mo	Mo	Mo	Mo	
	<i>Fis</i>	Mo	-0,43	Mo	Mo	Mo	Mo	
	<i>Val-P</i>	Mo	0,26	Mo	Mo	Mo	Mo	
	<i>N</i>	4	11	12	2	27	17	
	<i>N°all</i>	2	1	2	2	3	3	
	<i>riq.all</i>	1,971	1,000	1,907	2,000	1,947	1,235	
<i>GTP</i>	<i>div.g</i>	0,58	0	0,5	0,5	0,518	0,118	
	<i>Ho</i>	0,5	Mo	1,0	1,0	0,81	0,05	
	<i>He</i>	0,57	Mo	0,52	0,57	0,52	0,11	
	<i>Fis</i>	0,14	Mo	-1,00	-1,00	-0,57	0,50	
	<i>Val-P</i>	0,91	Mo	0,00*	0,63	0,001*	1,00	
	<i>N</i>	3	11	12	4	27	16	
	<i>N°all</i>	2	3	2	2	5	2	
	<i>riq.all</i>	1,667	1,763	1,907	1,971	1,633	1,584	
<i>PDH</i>	<i>div.g</i>	0,33	0,382	0,5	0,5	0,306	0,313	
	<i>Ho</i>	0,33	0,45	1,0	1,0	0,11	0,37	
	<i>He</i>	0,33	0,38	0,52	0,57	0,30	0,31	
	<i>Fis</i>	0,00	-0,19	-1,00	-1,00	0,64	-0,20	
	<i>Val-P</i>	1,0	0,57	0,00*	0,23	1,00	0,56	
	Promedio por locus							
		<i>N</i>	4,4	11	12	3,6	26,2	17,2
	<i>N°all</i>	1,6	1,8	1,8	1,8	2,6	2,2	
	<i>riq.all</i>	1,49	1,43	1,7256	1,7826	1,3456	1,3172	
X	<i>div.g</i>	0,28	0,22	0,4	0,4	0,1794	0,1598	
	<i>Ho</i>	0,386	0,48	1	1	0,33	0,26	
	<i>He</i>	0,46	0,38	0,52	0,57	0,296	0,26	
	<i>Fis</i>	0,158	-0,265	-1	-1	0,0176	0,1	
	<i>Val-P</i>	0,90	0,10	0,00*	0,01	0,21	0,51	

N = número de cepas; N° all = número de alelos; *riq.all* = riqueza alélica; *div.g* = diversidad genética; *Ho* y *He* = heterocigotos observados y esperados; Mo = monomórfico.

*Desviación significativa de las expectativas de Hardy–Weinberg ($valor-P \leq 0,0025$)

4.7. Análisis de desequilibrio de ligamiento

Los resultados de análisis del desequilibrio de ligamiento están presentados en el anexo 2. Para la mayoría de las poblaciones se estableció un bajo grado de LD entre los locus evaluados; tres de ellos asociados en 1 par de locus (Luribay ($PDH \times GTP$), Mecapaca ($PDH \times LAP$), Sap-Sap ($PDH \times GP$), una asociada en 2 pares locus (Sap-Cosi ($GTP \times GP$; $PDH \times GTP$)). En Qui-Urk se observaron seis pares de asociaciones significativas mostrando para esta población un alto grado de LD. Estos resultados fueron significativos con un *valor-P* menor de 0,05. En todas las otras poblaciones, no se puede rechazar la hipótesis nula de panmixia en la cual hay equilibrio de ligamiento entre locus.

4.8. Distancia genética entre poblaciones

Para entender mejor la estructura genética de las poblaciones se evaluaron los índices *Fst* de diferenciación entre pares de poblaciones (Tabla 8). El análisis de las distancias genéticas entre las poblaciones, muestra significancia para la mayoría de las poblaciones con excepción en Qui-Bsia x Qui-Urk y Qui-Bsia x Luribay esto por el proximidad de las poblaciones en Quillacollo y el reducido número en el caso de Luribay y Quillacollo.

Tabla 8. *Valor-P* de significación de los *Fst* obtenidos entre poblaciones

	N	Luribay	Mecapaca	Qui-Urk	Qui-Bsia	Sap-Sap	Sap-Cosi
Luribay	6	*					
Mecapaca	11	+	*				
Qui-Urk	12	+	+	*			
Qui-Bsia	4	-	+	-	*		
Sap-Sap	27	+	+	+	+	*	
Sap-Cosi	19	+	+	+	+	+	*

N número de cepas en la población; + = *Fst* significativamente diferente de cero; - = *Fst* no significativamente diferente de cero.

4.9. Análisis AMOVA de la estructuración entre las poblaciones

El análisis AMOVA para todos los locus ha permitido examinar la estructuración inter-poblaciones y también, después de una jerarquización de las poblaciones en diferentes grupos, la estructuración: entre grupos de poblaciones, entre poblaciones al interior de los grupos y al interior de las poblaciones (Tabla 9).

El primer análisis muestra una varianza significativa entre todas las poblaciones detectando así que existe una estructuración.

El segundo análisis examinó la estructuración geográfica de las poblaciones agrupándolas en dos grupos: el primero ubicado más al norte en el departamento de La Paz (Mecapaca, Sap-Sap, Sap-Cosi y Luribay) y el segundo ubicado más al sur en el departamento de Cochabamba (Qui-Urk y Qui-Bsia). Los resultados mostraron una diferenciación significativa, con 36,06 % de la variabilidad explicada por diferencias entre los grupos del norte y sur, evidenciando una estructuración entre estos grupos. Se observó también una estructuración significativa entre las poblaciones al interior de los grupos con un 19,04% de la variación. Al contrario las

diferencias no fueron significativas al interior de las poblaciones con un 44,90% de la variación.

Tabla 9. Resultados del análisis molecular de la varianza (Abramova, Burakova et al. 1979) para poblaciones de *T. cruzi* a diferentes agrupamientos.

Nivel de agrupamiento	Origen de la variación	% de la <i>valor-</i> variación	<i>P</i>	significancia*
(a) Todas las poblaciones	Entre poblaciones	44,09	0,000	+
	Al interior de las poblaciones	55,91		
(b) Grupos geográficos de poblaciones	Entre grupos	36,06%	0,000	+
	Entre poblaciones al interior de los grupos	19,04%	0,000	+
	Al interior de las poblaciones	44,90%	0,073	-

(a) Poblaciones en general; (b) aglomeraciones geográficas de poblaciones correspondientes a 2 departamentos (Figura 1): grupo 1=Luribay, Mecapaca, Sap-Sap y Sap-Cosi, grupo 2= Qui-Urk y Qui-Bsia; *(+) = Resultado significativo, (-) = Resultado no significativo.

4.10. Construcción de un árbol inter-poblaciones

Las relaciones genéticas entre las poblaciones se construyeron a partir de un árbol *neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987).

Se observa en el siguiente árbol (Figura 11), las distancias genéticas existentes entre las poblaciones del departamento de La Paz (Mecapaca, Luribay, Sap-Sap y Sap-Cosi) y del departamento de Cochabamba (Qui-Urk y Qui-Bsia), observado la gran distancia genética existente entre ambos sostenidos con un bootstrap de 100.

Las poblaciones dentro el departamento de La Paz no muestran estructuración significativa: Mecapaca con respecto a Luribay Sap-Sap y Sap-Cosi se ubican en dos ramas pero el valor de bootstrap es de solamente 67; igualmente para Luribay y Sapini

(Sap-Sap y Sap-cosi) el valor de bootstrap es de 66. Qui-BSIA y Qui-Urk presentan muy pequeñas distancias mientras Sap-Cosi y Sap-sap la distancia es mayor ; en los dos casos las poblaciones no son mas de 3 km.

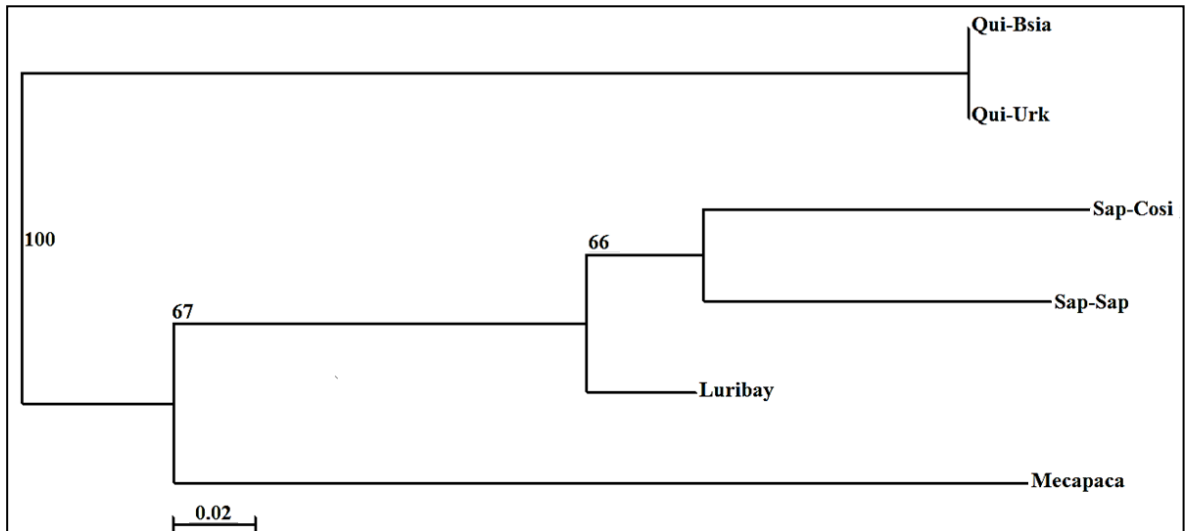


Figura 11. Relaciones genéticas entre poblaciones de *T. cruzi*, árbol construido a escala con el método *neighbor-joining* (NJ) usando los *Fst* como distancias genéticas.

4.11. Análisis filogenético de árboles y redes para los genes mitocondriales

4.11.1. Gen mitocondrial *COII*

Se realizaron los análisis para este gen sobre 97 secuencias, correspondientes a 10 secuencias de referencia (de TcII a TcVI y *T. c. marinkellei*) y 87 secuencias estudiadas de TcI (69 secuencias de las 6 poblaciones nacionales en estudio más 18 secuencias de referencia), de las cuales 5 de ellas están duplicadas para resolver así sus ambigüedades nucleotídicas, es decir, dos haplotipos por cepa con diferencias de dos nucleótidos polimórficos. A partir del total de estas secuencias el programa DNAsp generó 28 haplotipos de los cuales: 9 haplotipos (H1 a H9) agruparon a 69 secuencias de las 6 poblaciones en estudio y 2 secuencias de referencia (SABP3, CUICAc11), 11

haplotipos (H10 a H20) agruparon a secuencias de referencia de TcI, los haplotipos 21 y 22 (H21 y H22) agruparon a las dos cepas de referencia TcIV (STC10R_cl3 y 10R26), el haplotipo 23 (H23) correspondiente a la cepa de referencia TcVI (VFRA1_cl1), el haplotipo 24 (H24) agrupó a dos cepas de referencia de TcV (Bug2148, 92-80_cl2), los haplotipos 25 y 26 agruparon a las cepas de referencia TcIII, el haplotipo 27 agrupó a dos cepas de referencia de TcII (IVV_cl4, CBB_cl2), y finalmente el haplotipo 28 correspondiente a la secuencia de la cepa de referencia de *T. c. marinkellei* B7 (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de las cepas en función de los haplotipos y las DTUs para el gen mitocondrial *COII*

Cepa	Haplotipo	DTU ¹						Tcm ₂	Total
		TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV	TcVI		
SAP500, SAP492, SAP491, SAP445, SAP404, SAP310-1, SAP303-2, SAP302, SAP272, SAP271, SAP270, SAP267, SAP265-2, SAP263, SAP261, SAP260, SAP256, SAP242, SAP233, SAP223, SAP207, SAP203, SAP374, SAP346	H1*	24							24
SAP405, SAP391, SAP312, SAP266, SAP265-1, SAP264, SAP243, SAP241, MEC173, MEC171, MEC170, MEC161, MEC107, SAP349, SAP348, SAP347, SAP336-2, SAP318, SAP334-2	H2*	19							19
SAP310-2	H3*	1							1
SAP303-1, QUI916, QUI913, QUI907, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755, QUI054, SAP336-1, SAP323, SAP321, SAP319, SAP313, SAP334-1, SABP3, CUICAcl1, QUI775	H4*	21							21
MEC166	H5	1							1
MEC103, MEC102	H6	1							1
MEC099	H7	2							2
LUR258	H8	1							1
Z17, FX18	H9	1							1
V120, SP31, P209cl93, CUTIAcl1	H10	2							2
Saimiri4A	H11	4							4
PERU, Davisn3dimidiata	H12	1							1
OPS21cl11	H13	2							2
H10	H14	1							1
A269	H15	1							1
93070103P	H16	1							1
93041401P	H17	1							1
458	H18	1							1
361TA	H19	1							1
STC10R_cl3	H20	1							1
10R26	H21				1				1
VFRA1_cl1	H22				1				1
Bug2148, 92-80_cl2	H23						1		1
85/847_cl2	H24					2			2
M5631_cl5	H25			1					1
IVV_cl4, CBB_cl2	H26			1					1
Marinkellei B7 ²	H27		2						2
	H28							1	1
	Total	87	2	2	2	2	1	1	97

¹Discrete typing unit (unidad discreta de tipificación); ²*T. cruzi marinkellei*; *haplotipos que presentan cepas con ambigüedades.

El árbol filogenético de máximo de verisimilitud para el gen mitocondrial *COII* se muestra en la Figura 12. Se puede observar la gran distancia existente entre las cepas de la especie *T. cruzi* y la cepa de referencia de la especie *T. c. marinkellei* del haplotipo 28. Primero se muestra tres grandes grupos: cepas de *T. cruzi* I, III, IV, V, VI; cepas de TcII y la cepa de referencia Tcm (*T. c. marinkellei*). Seguidamente dentro el gran grupo de la especie *T. cruzi* se observa la estructuración de 2 otros grandes grupos, el primero con un valor de bootstrap significativo de 94 reuniendo a todas las cepas de las 6 poblaciones en estudio y cepas de referencia del grupo TcI (Hap 1 a 16,19 y 20), no se observó sub-estructuración significativa en este grupo. El segundo grupo sostenido con un valor de bootstrap de 91 reúne a todas las cepas de referencia del grupo Tc III, IV, V, VI y dos cepas de referencia de TcI (Hap17 y Hap 18) observando en estas una introgresión mitocondrial, es decir que esas dos cepas fueron clasificadas con genes nucleares de tipo TcI mientras muestran un tipo TcIII al nivel mitocondrial. Además dentro este grupo se observó una sub estructuración de tres cepas de referencia del grupo V y VI (haplotipos 23 y 24) que tenemos que interpretar con precaución porque no son más que dos haplotipos.

La red filogenética del gen *COII* (Figura 13a) confirma las mismas observaciones: gran distancia evolutiva entre la especie de *T. cruzi* con respecto a la especie de *T. c. marinkellei*; para la especie de *T. cruzi* se puede observar la notoria distancia evolutiva entre tres agrupaciones expresada por numerosas mutaciones que separan a estos: La primera corresponde a cepas de referencia del grupo TcII (Hap 27), la segunda corresponde a cepas de las 6 poblaciones en estudio y de referencia del grupo TcI, observando en estas un gran grupo monofilético. Además en la Figura 13b se detalla la distribución de las 6 poblaciones nacionales en estudio respecto a las cepas de referencia TcI mostrando que no existe sub estructuración para estas cepas por su corta distancia evolutiva. El último grupo corresponde a cepas de referencia de TcIII, TcIV, TcV, TcVI y 2 cepas de referencia (Hap 17 y 18) del grupo TcI que presentan una introgresión mitocondrial ya descrita en el árbol de máximo de verisimilitud. El camino evolutivo sugiere que *T. cruzi* se diversificó tomando dos caminos: el primero para el grupo TcII y el segundo mostrando 2 grupos por un lado al grupo TcI siendo este el

primero en agruparse y por otro lado los grupos TcIII y TcIV que a su vez dieron origen a TcV y TcVI.

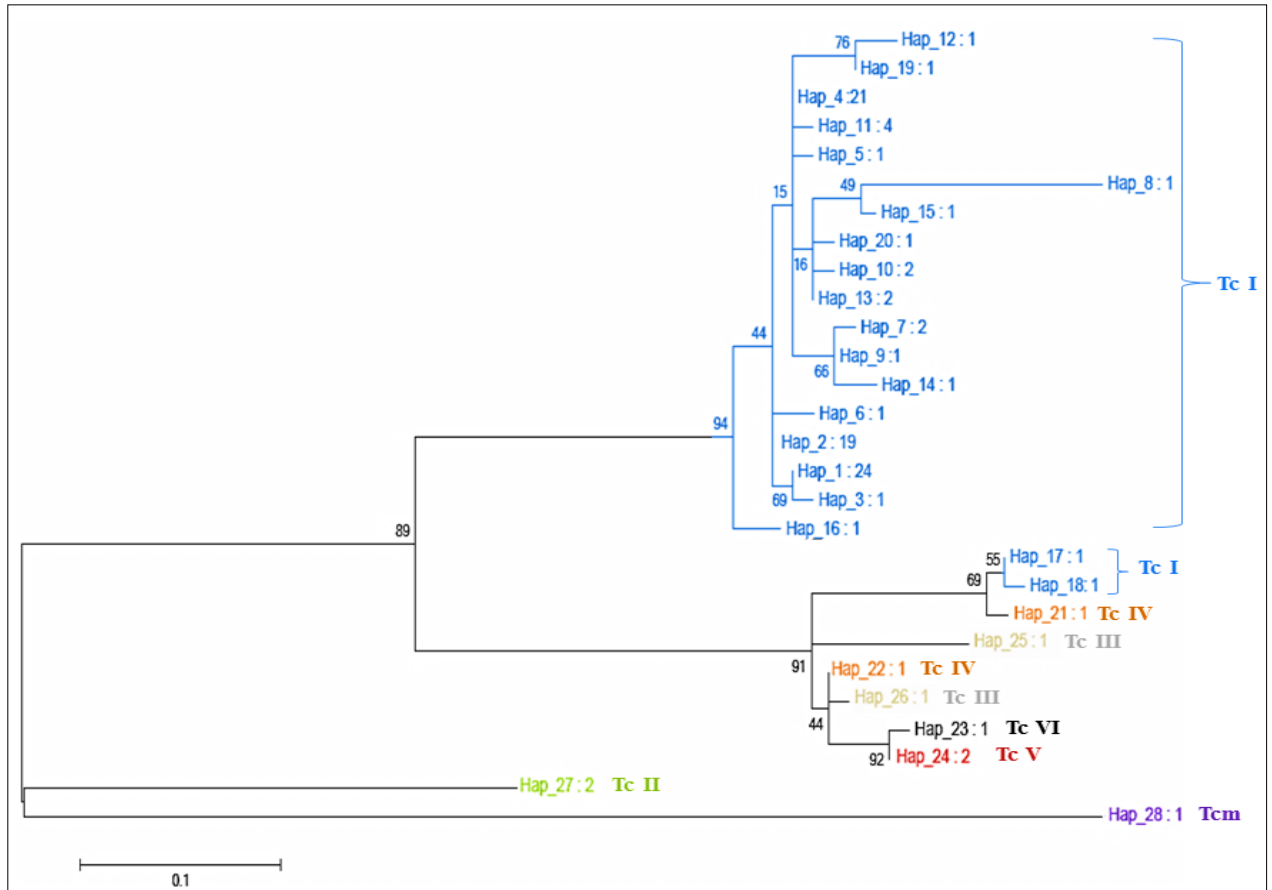


Figura 12. Árbol filogenético construido con el método de máximo de verosimilitud para el gen mitocondrial *COII*. El mejor modelo de sustitución fue Tamura 3-parameter

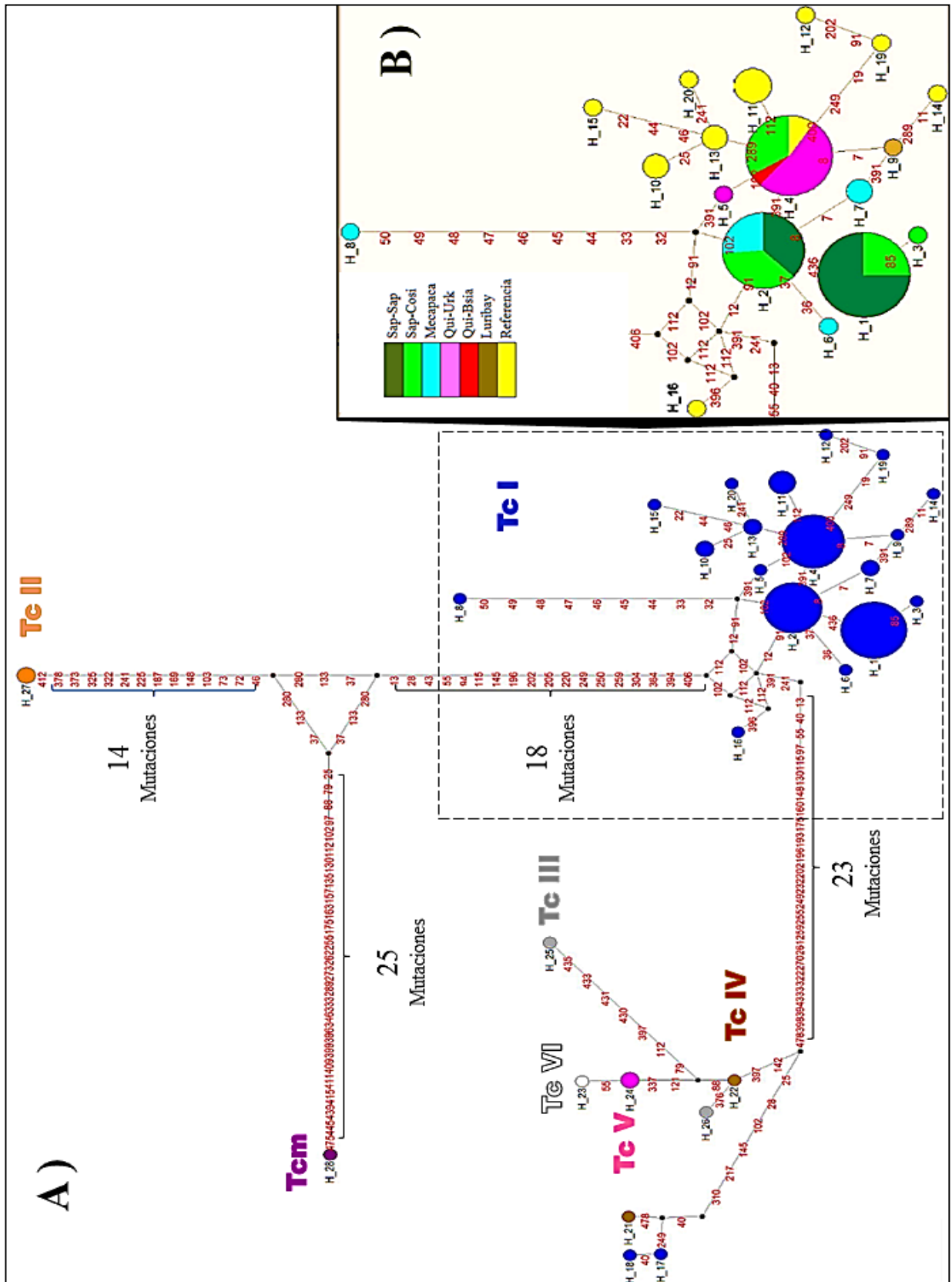


Figura 13. A) Red evolutiva (Median Joining network) de las diferentes DTUs estudiadas con el gen *COII*. Los puntos negros representan secuencias hipotéticas creadas por el programa, cada número rojo indica 1 mutación entre uno y otro haplotipo. Se observaron 5 árboles muy similares formando la red. B) Distribución de las 6 poblaciones nacionales respecto a cepas de referencia de *T. cruzi* I

4.11.2. Gen mitocondrial *CYTB*

Se realizaron los análisis para este gen sobre 98 secuencias, correspondientes a 11 secuencias de referencia (de TcII a TcVI y *T. c. marinkellei*) y 87 secuencias estudiadas de TcI (68 secuencias de 4 poblaciones nacionales en estudio, 19 secuencias de referencia), de las cuales 5 de ellas están duplicadas para resolver así sus ambigüedades nucleotídicas, es decir, dos haplotipos por cepa con diferencias de dos nucleótidos polimórficos. A partir del total de estas secuencias el programa DNAsp generó 18 haplotipos de los cuales: 2 haplotipos (H1 y H2) agruparon a 68 secuencias de 4 poblaciones nacionales en estudio y 6 secuencias de referencia (V120, SP31, P209c193, CUTIAc11, SABP3, CUICAc11), 8 haplotipos (H3 a H10) agruparon a secuencias de referencia de TcI, 2 haplotipos (H11, H15) agruparon a las cepas de referencia de TcII (CBB y TU18_cl2), 2 haplotipos (H12, H16) agruparon a las cepas de referencia de TcIII (M5631,CM17), 2 haplotipos (H13, H17) agruparon a las cepas de referencia de TcIV (10R26, STC10R), y finalmente el haplotipo 18 correspondiente a la secuencia de la cepa de referencia de *T. c. marinkellei* B7 (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de las cepas de *T. cruzi* en función de los haplotipos de diferentes DTUs para el gen mitocondrial *CYTB*.

Cepas	Haplotipo	DTU ¹							Total
		TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV	TcVI	Tcm ²	
SAP500, SAP492, SAP491, SAP445, SAP405, SAP404, SAP391, SAP374-1, SAP349, SAP348, SAP347, SAP336-1, SAP334-1, SAP318, SAP312, SAP310, SAP304, SAP303-1, SAP302, SAP272, SAP271, SAP270, SAP266, SAP265, SAP264, SAP263, SAP261, SAP260, SAP259, SAP256, SAP243, SAP242bis, SAP242, SAP241, SAP233, SAP223, SAP207, SAP203, MEC102, MEC173, MEC171, MEC170, MEC166, MEC161, MEC107, MEC103, MEC101, V120, SP31, P209c193, CUTIAc11	H1*	51							51
SAP374-2, SAP337, SAP336-2, SAP334-2, SAP323, SAP321, SAP319, SAP313, SAP303-2, QUI916, QUI913, QUI907, QUI775, QUI774, QUI769, QUI768, QUI766, QUI763, QUI762, QUI757, QUI755, SABP3, CUICAc11.	H2*	23							23
SAP372	H3	1							1
Z17, PERU, OPS21cl, H10, FX18, 361TA.	H4	6							6
Saimiri4A	H5	1							1
PB3cl2	H6	1							1
G-38-01	H7	1							1

A269	H8	1							1
93070103P	H9	1							1
458	H10	1							1
CBB	H11		1						1
M5631	H12			1					1
10R26	H13				1				1
92.80, SC43, Guateque, Tulahuen.	H14					2	2		4
TU18_cl2	H15		1						1
CM17	H16			1					1
STC10R	H17				1				1
<i>T. c. marinkellei</i> B7	H18							1	1
	Total	87	2	2	2	2	2	1	98

¹Discrete Typing Unit (unidad discreta de tipificación); *haplotipos que presentan cepas con ambigüedades.

El árbol filogenético de máximo de verisimilitud para el gen mitocondrial *CYTB* está presentado en la Figura 14. Evidencia la gran distancia existente entre las cepas de la especie *T. cruzi* y la cepa de referencia de la especie *T. c. marinkellei* (Hap_18). Como para *COII*, dentro la especie *T. cruzi* se observaron 2 ramas principales, la primera soportada con un bootstrap de 99 correspondiente a dos cepas del grupo *T. cruzi* II (Hap 11 y 15), la segunda rama soportada con un bootstrap de 79, correspondiente a cepas de los grupos *T. cruzi* I, III, IV, V, VI; dentro este grupo se observa la estructuración de 2 grupos fuertemente diferenciados: El primero corresponde a cepas del grupo TcI, que a su vez muestra una tendencia a sub-estructurarse con un pequeño grupo correspondiente a los haplotipos 1, 2, 3 (cepas de 4 poblaciones en estudio y 6 cepas de referencia) soportado por un bootstrap de 83. El segundo grupo soportado por un bootstrap de 97 corresponde a cepas de referencia de los grupos *T. cruzi* III, IV, V, VI (Hap 12, 13, 14, 16 y 17) y una cepa de referencia del grupo TcI (Hap_9) confirmando para esta el caso de introgresión mitocondrial ya observado con *COII*. Además este grupo mostro una tendencia a una sub estructuración para dos cepas de *T. cruzi* I y IV (Hap 9, 17); aquí también tenemos que ser prudentes acerca de subgrupos de dos haplotipos solamente.

En la red filogenética del gen mitocondrial *CYTb* (Figura 15a), se puede observar la gran distancia evolutiva de la especie *T. cruzi* con respecto a *T. c. marinkellei*. *T. cruzi* se diversificó tomando dos caminos en el tiempo: El primero muestra la evolución de dos grupos diferenciados notoriamente TcII y TcI, ambos evolucionaron separadamente a partir de ancestro hipotético. En el grupo TcI en la Figura 15b se observa la distribución de cepas de 4 poblaciones nacionales en estudio respecto a las cepas de referencia. El segundo camino muestra la divergencia de las cepas tipo TcIII, TcIV, TcV, TcVI y una cepa del grupo TcI (H9) mostrando nuevamente el fenómeno de introgresión mitocondrial ya observado con *COII*.

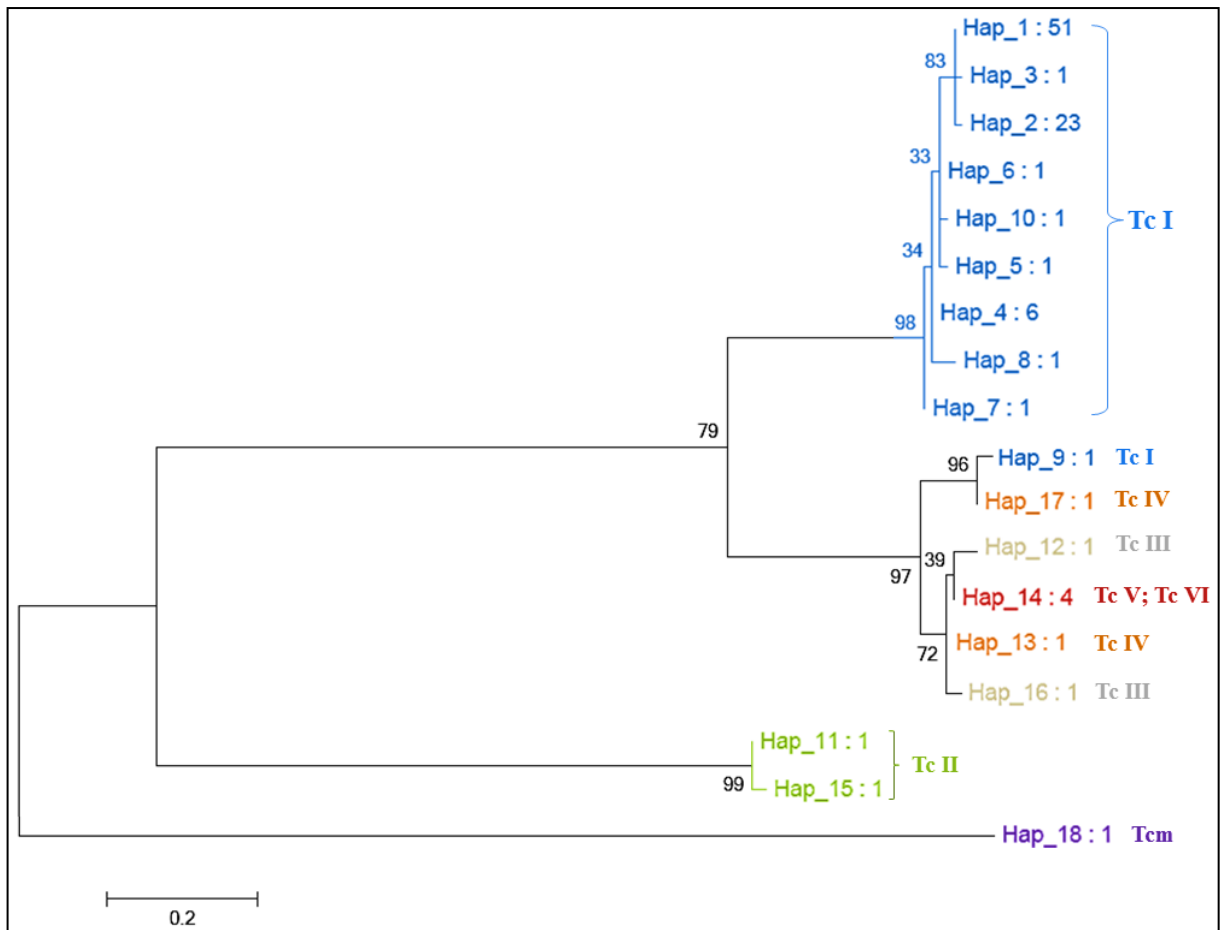


Figura 14. Árbol filogenético construido con el método de máximo de verosimilitud para el gen mitocondrial *CYTb*. El mejor modelo de sustitución fue Tamura 3-parameter.

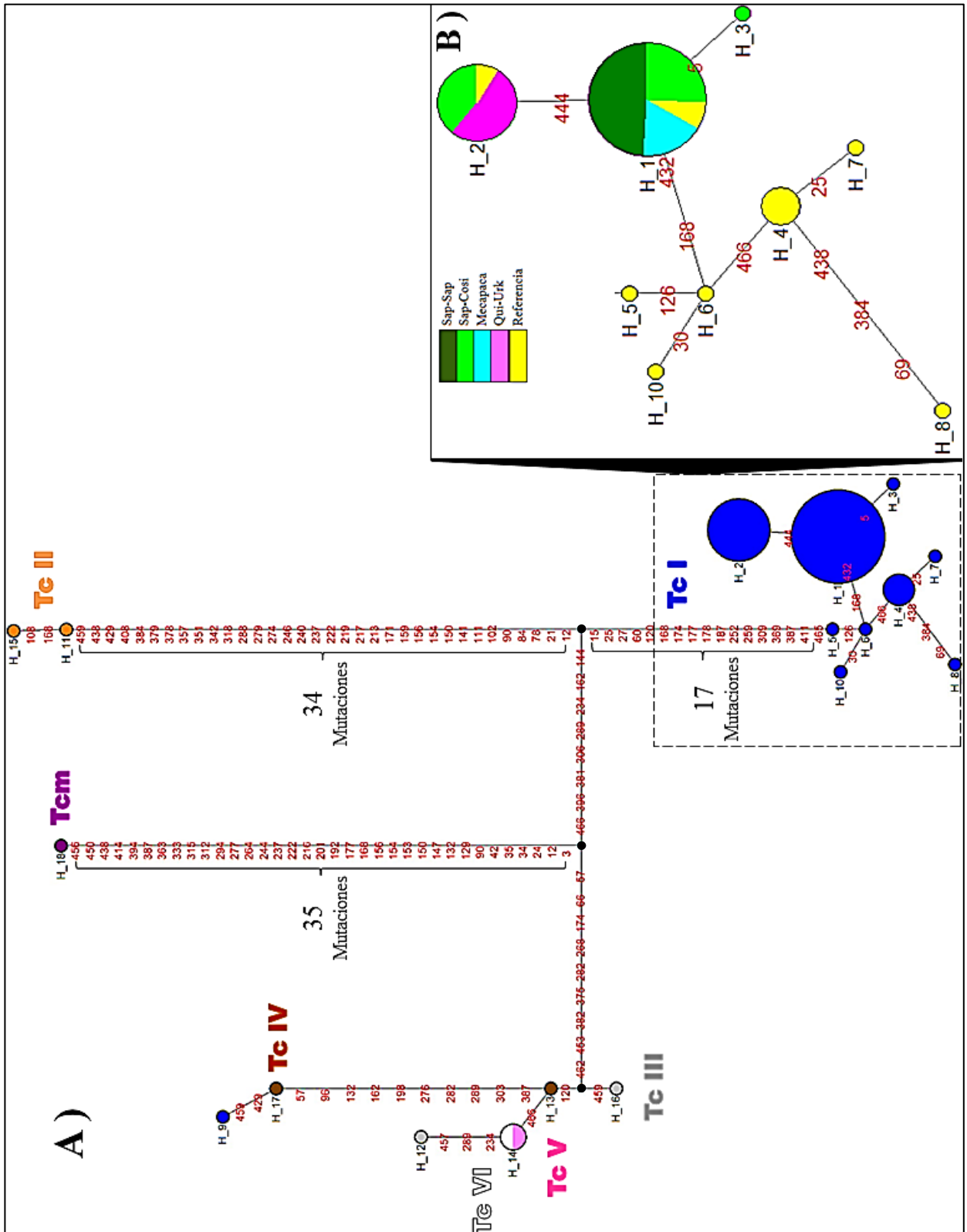


Figura 15. A) Red evolutiva (Median Joining network) de las diferentes DTUs estudiadas con el gen *CYTb*. Los puntos negros representan secuencias hipotéticas creadas por el programa, cada número rojo indica 1 mutación entre uno y otro haplotipo. Se observaron 4 árboles muy similares formando la red. B) Distribución de 4 poblaciones nacionales respecto a cepas de referencia de *T. cruzi* I.

5. DISCUSIÓN

La situación epidemiológica de la tripanosomiasis Americana es muy compleja debido a factores como dispersión del vector, migración humana y perturbación ecológica, característica de toda la región.

A pesar del control vectorial llevado a cabo por los diferentes países aún se observa una fuerte persistencia de la enfermedad. Últimamente se ha generado preocupación a nivel del INCOSUR por la descripción de focos silvestres de *T. infestans* en Bolivia, debido a que podrían tener incidencia en el éxito de la lucha contra la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en la Región (Noireau *et. al.*, 2009).

En el presente estudio se desarrolló un enfoque MLST con el objetivo de explorar la diversidad genética dentro y entre poblaciones de *T. cruzi* I recogidos de diferentes escalas geográficas en entornos silvestres, basado en siete fragmentos genéticos estructurales optimizados en una combinación de blancos de genes de dos esquemas propuestos recientemente (Lauthier, Tomasini *et al.* 2012; Messenger, Llewellyn *et al.* 2012). Estos análisis proporcionaron información valiosa sobre la diversidad genética poblacional y el comportamiento de esta especie, un tema muy importante en el esfuerzo de correlacionar epidemiología de la enfermedad y la genética de parásito, que nos dará un mayor entendimiento de la dinámica de transmisión del parásito y su influencia en las características clínicas.

En este sentido se amplificaron los fragmentos de genes propuestos en todas las poblaciones con las mismas condiciones experimentales, y en todos los casos se obtuvo solo el fragmento esperado. Sugiriendo que los blancos de genes seleccionados son técnicamente adecuados para el estudio de *T. cruzi*.

Los análisis presentados de los genes nucleares en estudio, detectaron la presencia de cepas homocigotas y heterocigotas esto como consecuencia de la estructura diploide ya documentada de *T. cruzi* (El-Sayed, Myler *et al.* 2005). Los resultados muestran un total de 82 cepas de *T. cruzi* (TcI) en diferente proporción dentro los genes

nucleares que presentaban uno o más de estos sitios heterocigotos. La condición heterocigótica observada podría reflejar una heterocigosis causada por mutación o intercambio genético dentro del grupo TcI. En este sentido no se puede descartar que los genotipos heterocigotos encontrados representen eventos de intercambio génico entre genotipos homocigotos (Bogliolo, Lauriapires et al. 1996; Machado & Ayala 2001; Gaunt, Yeo et al. 2003; Sturm, Vargas et al. 2003).

Así también se observó en los genes mitocondriales *COII* y *CYTB* incertidumbres en ciertas cepas de la población de Sapini, que interesantemente llamaron la atención ya que estos resultados son poco esperados por el hecho que los genes mitocondriales son haploides de herencia uniparental y carecen de recombinación (Gaunt, Yeo et al. 2003). Una posible explicación para estas incertidumbres encontradas podría ser la existencia de variados genotipos en zonas endémicas, reportado en Bolivia mostrando casos en los que se encontraron múltiples genotipos a partir del vector (Bosseno, Telleria et al. 1996). Así también reportes de infecciones mixtas y genotipos distintos encontrados dentro mamíferos en ecotopos silvestres (Llewellyn, Rivett-Carnac et al. 2011). Otra explicación que no la podemos descartar es la idea de una situación de heteroplasmia (múltiples genomas mitocondriales dentro un parásito), que podría ser causada por situaciones como mutación y/o herencia bi-parental en eventos de intercambio genéticos (Messenger, Llewellyn et al. 2012).

5.1. Diversidad Genética

Dentro los valores de diversidad genética observamos claramente que la combinación de genes mitocondriales y nucleares recomendados (Lauthier et al. 2012, Messenger et al. 2012) son marcadores muy apropiados para el análisis de genética de poblaciones por su grado de polimorfismo, y también porque la diversidad encontrada locus por locus varía poco.

La diversidad tanto de genes mitocondriales como de genes nucleares muestra más de 1% de sitios variables sobre la totalidad de las secuencias, lo que es bastante

elevado. Estos sitios muestran en promedio ser 3 veces más elevadas en los genes mitocondriales que en los genes nucleares; de la misma manera exhiben un mayor número de haplotipos en promedio para los genes mitocondriales. Estos resultados eran de esperarse debido a que los genes mitocondriales poseen tasas de mutación más elevadas (Lewis et al 2011).

Así mismo los datos obtenidos para los diferentes índices de diversidad en promedio presentaron valores más elevados de diversidad haplotípica en los genes mitocondriales con respecto a los genes nucleares, pero con una baja diversidad nucleotídica para ambos. El bajo nivel de diversidad molecular de los genes podría ser limitante para discriminar posibles niveles de diferenciación genética (Bargues, Klisiowicz et al. 2008).

Los parámetros de diversidad poblacional de *T. cruzi* I realizado con los cinco loci nucleares mostraron hasta 5 alelos diferentes de los cuales la población de Sap-Sap es la que presenta mayor número en promedio, éstos resultados eran de esperarse, por ser esta población la que cuenta con mayor número de cepas y además se demuestra el carácter concreto y objetivo de MLST como resultado de los polimorfismos que presentaron tres de los cinco loci; coincidiendo con reportes previos de análisis por microsatélites realizados en estas poblaciones (Barnabé, Buitrago et al. 2013). Pero al mismo tiempo difieren interesantemente en los valores promedio de heterocigocidad, diversidad genética y riqueza alélica, observándose elevados valores en las poblaciones de Quillacollo, producto de la estricta ausencia de individuos homocigotos en estas poblaciones.

5.2. Recombinación dentro la especie *T. cruzi*

Según previa recomendación (de Meeus & Balloux 2004), utilizamos dos tipos de parámetros clásicos en genética de poblaciones para estudiar el modo de reproducción de *T. cruzi* (equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento) observando que, de las seis poblaciones potencialmente panmícticas analizadas, en cinco

de ellas (Luribay, Sap-Cosi, Sap-Sap, Qui-Bsia y Mecapaca) no se puede excluir la panmixia. Examinando los datos locus por locus y teniendo en cuenta la presencia de heterocigocia fijada en las dos poblaciones de Quillacollo, que es un índice fuerte de clonalidad, podemos considerar que solo las 4 poblaciones del departamento de La Paz (Luribay, Mecapaca, Sap-Cosi y Sap-Sap) están en equilibrio panmictico mientras las dos poblaciones del departamento de Cochabamba (Qui-Bsia y Qui-Urk) presentaron clonalidad. Para explicar la falta de rechazo de H_0 en cuatro poblaciones, tal vez podríamos inferir a la falta de poder de los test; sin embargo, un error tipo II (falso negativo), es poco probable ya que por el tamaño de población comparable los test pueden rechazar o no la H_0 . Además, la multiplicación de las pruebas disminuye la probabilidad de error tipo II y aumenta la potencia de la prueba. Por lo tanto podemos considerar que el rechazo de H_0 en esas poblaciones es equivalente a aceptar una posible panmixia.

Para las pruebas de panmixia la primera condición exigida es la simpatria natural; de hecho, una muestra no simpátrica nos conduce a una posible estructuración genética (efecto Wahlund) que rechazara una posible panmixia. En este sentido como no se sabe precisamente lo que es una zona simpátrica para este parásito, se recolectaron las poblaciones dentro de un área pequeña, a no más de una hectárea, en la que se asume que los triatomíneos y los mamíferos huéspedes pueden moverse lo suficiente como para transmitir los parásitos de un hospedero a otro, generando oportunidades para posibles intercambios genéticos; así que las poblaciones fueron asignadas como “potencialmente panmicticas” (Barnabe et al. 2013). De este modo, cuando los tests no rechazan H_0 , podemos considerar, que estas poblaciones son realmente simpátricas. En sentido inverso, cuando H_0 es rechazada, como el caso en la población de Qui-Urk podríamos atribuir a un probable efecto Meselson por qué además demuestra en esta población, un notable exceso de heterocigosis. Sin embargo como lo dijimos ya, la presencia de heterocigocia fijada en ciertos locus es más probablemente la marca de la clonalidad para las poblaciones de Quillacollo.

Desde los primeros estudios con isoenzimas *T. cruzi* ha sido considerado por la mayoría de los autores por poseer una estructura poblacional predominantemente clonal,

con ocasionales episodios de intercambio genético o hibridación. Estos hechos fueron confirmados en muchas ocasiones con diversos marcadores genéticos y se propuso una teoría clonal de parásitos protozoarios (Tibayrenc, Kjellberg et al. 1990; Tibayrenc & Ayala 1991), la teoría fue reafirmada en especial con los géneros de *Trypanosoma* y *Leishmania* (Tibayrenc & Ayala 1999) y se amplió a bacterias hongos y virus (Tibayrenc & Ayala 2012). Determinar si se producen o no intercambios genéticos en *T. cruzi*, esclarece el panorama de la dinámica de este parásito, en este caso una reducción o ausencia de flujo genético (clonalidad) tendría un gran impacto sobre las propiedades biológicas y médicas de los parásitos que fue ya explorado (Laurent, Barnabé et al. 1997; Revollo, Oury et al. 1998). Por otra parte, posibles intercambios genéticos podrían conferir la capacidad para transferir a la progenie por ejemplo resistencia a medicamentos, intercambios en la patogenicidad y/o resistencia en las defensas del huésped.

Los intercambios genéticos pueden adoptar diferentes formas, uno de ellos es la generación de híbridos (Gaunt, Yeo et al. 2003), jugando un papel crucial en la evolución de *T. cruzi* (generación de nuevas DTU). Caracterizados por una fusión de genotipos parentales, pérdida de alelos, recombinación homóloga, y cinetoplasto con herencia uniparental (Lewis, Llewellyn et al. 2009). Además de la hibridación, otra forma de posible recombinación se evidenció por incongruencias encontradas en árboles filogenéticos mostrando introgresión o heteroplasmia mitocondrial. La última forma de intercambios genéticos podría acontecer por mecanismos de recombinación convencional, como para los organismos superiores diploides y sexuados, detectables por herramientas habituales de genética de poblaciones como se mostro aquí.

De este modo muchas investigaciones se dedicaron a trabajar en torno a la posible recombinación en *T. cruzi*, uno de los primeros reportes con el locus fosfoglucomutasa muestra frecuencias homocigotas y heterocigotas, casi idénticas a las predichas por la distribución teórica de Hardy-Weinberg en cepas salvajes de TcI (Carrasco, Frame et al. 1996). Posteriormente sobre la base del modelo clonal fue sugerida la existencia de un cierto nivel de recombinación genética en TcI selvático (Llewellyn, Miles et al. 2009), en áreas endémicas de Ecuador TcI y TCIII (Llewellyn, Lewis et al. 2009; Ocana-

Mayorga, Llewellyn et al. 2010). Seguidamente, 3 investigaciones recientes enfatizaron el rol de los intercambios genéticos y la extraordinaria plasticidad del genoma de *T. cruzi*: (i) con el uso de la genómica CNV (variación en el número de copias) (Minning, Weatherly et al. 2011), (ii) en Colombia con el reporte de enormes incongruencias entre marcadores nucleares y mitocondriales, secuencias mosaico del maxicírculo y el mecanismo de reordenación genética de TcI surgiendo recombinación (Ramirez, Guhl et al. 2012) (iii), mientras otros autores demostraron que cepas híbridas contienen haplotipos mosaico, originado probablemente por recombinación intragénica (Ferreira & Briones 2012).

Finalmente el último estudio realizado con microsatélites que fue al inicio de este trabajo, demostró probable panmixia para cuatro poblaciones salvajes de TcI en Bolivia (Barnabé, Buitrago et al. 2013). Frente a todos estos ejemplos, cabe recalcar que la hibridación o introgresión pueden ocurrir entre DTUs distantes, mientras que los eventos de recombinación similares a las que ocurren en organismos sexuales en *T. cruzi*, generalmente son intra-DTU, como se muestra en el presente estudio. "clonalidad o intercambios genéticos" para *T. cruzi*, no tiene que ser un tema de debate, ya que este organismo obviamente ha utilizado ambos mecanismos para evolucionar y probablemente para adaptarse a sus múltiples huéspedes, asociados a su extraordinaria plasticidad del genoma conformado por evolución clonal y varios tipos de intercambios genéticos. Según la última revisión de Tibayrenc y Ayala (2013), La definición de "evolución clonal" se tiene que entender que *T. cruzi* lleva este tipo de propagación de manera preponderante (PCE = "preponderant clonal evolution"), es decir que los intercambios genéticos son extremadamente restringidos, pero no están ausentes.

Los resultados del presente estudio sugieren que el parásito puede alternar entre reproducción clonal o de tipo PCE y reproducción sexuada, tal vez no totalmente panmictica, pero que incluye una cierta proporción de intercambios genéticos; eso en zonas geográficas no tan separadas (La Paz y Cochabamba), por causas todavía desconocidas que sería interesante descubrir. Además surge interés de estudiar otras zonas endémicas con las mismas herramientas para saber si este tipo de alternancia aparente entre clonalidad y sexualidad podría ser generalizada o si este fenómeno está restringido a poblaciones bolivianas. Es importante recalcar que nuestros resultados

corroboran solo en parte los resultados previos obtenidos con microsatélites (Barnabe et al. 2013), en los cuales fueron las poblaciones de Luribay Sap-Cosi y Qui-Urk que parecían en equilibrio panmítico. Sin embargo y sin poder explicar el resultado contradictorio de Qui-Urk, ambos resultados van en el mismo sentido, es decir la existencia de recombinación dentro ciertas poblaciones y no en otras.

5.3. Estructuración de las poblaciones de *T. cruzi* en Bolivia

Se observó una mayoría de diferencias significativas entre pares de poblaciones, lo que significa que las poblaciones tienen frecuencias alélicas distintas y entonces que hay un nivel alto de estructura genética de TcI en Bolivia, debido a factores geográficos., sobre todo entre las dos zonas más lejanas que son Cochabamba y La Paz. Estudios previos mostraron la dificultad para observar fuertes estructuraciones entre poblaciones de áreas silvestres, por el hecho de que los mamíferos huéspedes son poco estables y pueden recorrer grandes distancias. En este sentido existen pocos reportes en relación a poblaciones silvestres en Bolivia. Un estudio sobre poblaciones de vectores (*T. infestans*) silvestres recolectados cerca de Quillacollo, cuya distancia máxima es de aproximadamente 1 km, muestra diferenciación entre sólo algunas poblaciones (Richer, Kengne et al. 2007). Otro estudio en poblaciones silvestres e intra-peridomésticas de *T. infestans*, muestra una fuerte estructuración poblacional dentro de cada entorno (Breniere, Salas et al. 2013).

En este sentido nuestros resultados, apoyan a que el flujo de genes limitado entre las poblaciones silvestres a pequeña escala geográfica, parece haber generado un alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones. Esta estructuración se puede explicar tal vez por la baja capacidad de los vectores para moverse activamente, caminando o volando o debido a que las colonias de vectores se forman a partir de pocos ejemplares (efecto fundador). Los factores que influyen en la dispersión aún son poco conocidos y la dispersión sigue siendo un parámetro muy importante que nos conduce a importantes consecuencias epidemiológicas, tales como la colonización de nuevos ecotopos e introducción de nuevas cepas en ciclos domésticos. Seguir estudios genéticos

con herramientas similares a las presentadas sin duda nos ayudara a mejorar el entendimiento de los mecanismos epidemiológicos que son relevantes para el control de la enfermedad en Bolivia.

5.4. Análisis filogenéticos

Los árboles y las redes en el presente estudio, fueron muy similares para ambos genes mitocondriales, las topologías de COII y CYTB tienen muchos rasgos en común siendo ambos genes constituyentes del maxicirculo y posiblemente obedecen a reglas evolutivas similares. Respecto a *T. c. marinkellei* en nuestro análisis resulto ser un excelente grupo externo evidenciando así la gran distancia evolutiva existente con *T. cruzi*, que según reportes previos ambos divergen en aproximadamente 6 millones de años, lo que justifica así su uso como grupo de referencia (Lauthier, Tomasini et al. 2012)

Para *T. cruzi* la herencia uniparental del ADN del maxicirculo, así como los linajes híbridos TcV y TcVI quedo ya demostrada (Gaunt, Yeo et al. 2003; Subileau, Barnabé et al. 2009; Lewis, Llewellyn et al. 2011), y de acuerdo a esto, el número esperado de grupos mitocondriales dentro *T. cruzi* deberían ser cuatro, correspondientes a las DTU TcI, TcII, TcIII y TcIV, con TcV y TcVI (híbridos) agrupados en TcIII o TcIV. Sin embargo en nuestros resultados tanto en las redes como en los árboles filogenéticos para ambos marcadores, muestran sólo tres agrupaciones relevantes: primero un escenario en que TcI y TcII son los grupos más distantes filogenéticamente y por otra parte un grupo intermedio formado por las DTU TcIII-IV-V-VI. Estos resultados fueron evidenciados también por reportes previos (Souto, Fernandes et al. 1996; Momen 1999; Barnabé, Brisse et al. 2000; Brisse, Barnabé et al. 2000). El escenario TcI y TcII y su posición taxonómica, manifiesta a ambos como entidades monofileticas, con importantes distancias genéticas, separados hace millones de años (Briones, Souto et al. 1999; Kawashita, Sanson et al. 2001; Machado & Ayala 2001). Por el contrario, el grupo TcIII-IV-V-VI podría ser el resultado de mosaicismo (Gaunt et

al. 2003) entre TcI y TcII, consecuencia de probables eventos de recombinación homóloga entre alelos de ambos DTU originando este grupo TcIII-IV-V-VI, fenómeno que ya fue evaluado por reportes previos de secuencias mosaico en genes nucleares (Sturm, Vargas et al. 2003; Westenberger, Barnabé et al. 2005; Sturm & Campbell 2009; Ferreira & Briones 2012), en DNA 195-bp satélite (Ienne, Pedroso et al. 2010), y en genes mitocondriales de cepas TcI (Ramirez, Guhl et al. 2012).

Además de esto interesantemente encontramos en el grupo TcIII-IV-V-VI, a dos cepas de referencia de TcI (clasificadas previamente en función a genes nucleares) en ambos marcadores mitocondriales COII y CYTB; esta incongruencia de topologías entre los árboles y redes filogenéticas de genes mitocondriales frente a marcadores nucleares que agruparon a estas cepas en el grupo TcI (datos no mostrados) muestra claramente el fenómeno de introgresión mitocondrial. Este fenómeno es común en la naturaleza y fue reportado por primera vez en *T. cruzi* (Machado & Ayala 2001) mediante el descubrimiento de genealogías incongruentes entre genes mitocondriales frente a genes nucleares. Seguidamente con reportes similares introgresión mitocondrial han sido citados: en Bolivia incongruencias entre TcV y TcI (Barnabé & Brenière 2012) En Venezuela, el norte de América y Brasil entre TcI y TcIV (Lima, Jansen et al.; Messenger, Llewellyn et al. 2012). Introgresión mitocondrial común en la naturaleza, introduce variaciones en las poblaciones sobre las que la selección natural puede actuar, y es incompatible con un modelo de estricta clonalidad. Sugiriendo intercambio genético dentro TcI, siendo esta DTU más susceptible a recombinaciones que fue observada también por otros autores (Ramírez JD 2012, Ocaña-Mayorga S 2011). Estas probables recombinaciones ya mencionadas refuerzan la idea que, en este parásito pueden ocurrir intercambios genéticos y aunque el mecanismo y la frecuencia para estos eventos aún sean poco conocidos continúan influenciando en la estructura natural de las poblaciones de *T. cruzi*. La recombinación es un límite importante en todo estudio filogenético que teóricamente debe hacerse con marcadores no recombinantes, sean estos mitocondriales o nucleares en un marco estrictamente clonal. En el caso de *T. cruzi* hay entonces que tener en cuenta la posibilidad de introgresión mitocondrial y a posibilidad de intercambio genético intra-DTU para interpretar cualquier árbol o red evolutiva en el futuro.

6. CONCLUSIONES

- Estos resultados confirman la existencia de panmixia en cuatro poblaciones del departamento de La Paz, demostrando además que la técnica MLST utilizada es altamente efectiva y de gran utilidad en genética de poblaciones, por su alto nivel de variación y carácter discriminatorio, incluso al nivel de poblaciones pequeñas y localizadas, como lo observado en el presente estudio, que puede aplicarse dentro de una DTU en zonas geográficas restringidas.
- El estudio permitió observar una importante diversidad de los marcadores mostrando mayor variabilidad dentro de los genes mitocondriales, en comparación con los nucleares evidentemente por ser estos genes estructurales con tasa de evolución lenta. Además llamó la atención la presencia de incertidumbres en genes mitocondriales fenómeno que aún no está claro, presumiblemente debido a la presencia de cepas multiclonales o heteroplasmia.
- Según el método de máximo de verosimilitud los árboles coincidieron con las redes filogenéticas revelando claramente a tres grupos significativos: TcI, TcII confirmando a ambos como grupos diferenciados con distancias genéticas importantes y un grupo intermedio formado por TcIII-IV-V-VI no detectamos diferenciación entre las cepas híbridas porque los genes mitocondriales son de transmisión uniparental. Además según los valores de *bootstrap* observados descartamos la estructuración significativa dentro de TcI selvático.
- Dentro del análisis identificamos incongruencias de topologías entre árboles y redes filogenéticas de genes mitocondriales, frente a marcadores nucleares comprobando de esta manera el fenómeno de introgresión mitocondrial.
- Observamos un alto nivel de estructura genética y diferenciación entre las poblaciones de TcI silvestre en Bolivia a causa de los factores geográficos sobre

todo entre las poblaciones de La Paz y Cochabamba producto del flujo genético limitado existente en estas poblaciones.

- Una recombinación entre cepas de tipo clásica es posible en cuatro poblaciones del departamento de La Paz (Luribay, Mecapaca y dos de Sapini), mostrando claramente que en *T. cruzi* ocurre recombinación en poblaciones simpátricas, con todas las implicaciones al nivel biológico y epidemiológico mencionados.
- Hemos puesto en evidencia dos tipos de propagación del parásito, aparentemente recombinante en poblaciones de La Paz, y por otro lado de forma clonal en poblaciones de Quillacolo (Cochabamba), mostrando que el parásito puede cambiar de estrategia de propagación adoptando diferentes mecanismos según criterios que todavía faltan determinar.

Por todas estas razones y el alcance obtenido en el presente trabajo, el uso de la técnica MLST como herramienta en genética de poblaciones es muy prometedora para futuros estudios en *T. cruzi* y debería ser desarrollado a mayor escala.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 1;201(9):1308-15.
- Abad-Franch, F., et Aguilar, H.M. (2000) Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. Datos y reflexiones para una política de estado. Rev. Del Instituto Juan César García 10: 12-32.
- Abramova, N. B., T. A. Burakova, V. P. Korzh and A. A. Neifakh (1979). "[Injection of mitochondria into oocytes and fertilized eggs]." Ontogenez 10(4): 401-405.
- Aliaga, C., S. F. Breniere and C. Barnabé (2011). "Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups." Infect Genet Evol 11(5): 1155-1158.
- Araujo C.A., Waniek P.J., Xavier S.C. and Jansen A.M. 2011. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. Exp.Parasitol.127 (1) 308-312.
- Andrade, S. G. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. Rev Patol Trop 3: 65-121.
- Andrade, S. G. and J. B. Magalhaes (1996). "Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology." Rev Soc Bras Med Trop 30(1): 27-35.
- Andrade, S. G. and J. B. Magalhaes (1997). "Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology." Rev. Soc. Brasileira Med. Trop. 30(1): 27-35.
- Andrade, V., C. Brodskyn and S. G. Andrade (1983). "Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*." Trans R Soc Trop Med Hyg 77(6): 796-799.
- Bandelt, H. J., P. Forster and A. Rohl (1999). "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies." Mol Biol Evol 16(1): 37-48.
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma (2006). "Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size". Infect Genet Evol. 6(1):46-62.

- Bargues, M. D., D. R. Klisiowicz, et al. (2008). "Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*." PLoS Negl Trop Dis 2(5): e233.
- Barnabe, C. Buitrago, R. Bremond, P. Aliaga, C. Salas, R. Vidaurre, P. Herrera, C. Cerqueira, F. Bosseno, MF. Waleckx, E. Breniere, SF (2013). Putative panmixia in restricted populations of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild *Triatoma infestans* in Bolivia. PLoS One 29;8(11):e82269.
- Barnabé, C. and S. F. Brenière (2012). "Scarce events of mitochondrial introgression in *Trypanosoma cruzi*: New case with a Bolivian strain." Infect Genet Evol 12: 1879-1883.
- Barnabé, 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 (Pt 5): 513-526.
- Barnabé, C., R. Buitrago, P. Bremond, C. Aliaga, R. Salas, P. Vidaurre, C. Herrera, F. Cerqueira, M. F. Bosseno, E. Waleckx and S. F. Breniere (2013). "Putative Panmixia in Restricted Populations of *Trypanosoma cruzi* Isolated from Wild *Triatoma infestans* in Bolivia." PLoS One 8(11): e82269.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste and F. Bonhomme (1996). "1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bittencourt, A.L., Gomes, M.C. (1967) Gestacoes sucessias de uma paciente chagásica com ocorrência de casos de transmissão congênita da doenca. Gazeta Médica Bahia 67: 166-172.
- Bittencourt, A. L. (1992). "Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 34(5): 403-408.
- Bogliolo, A. R., L. Lauriapires and W. C. Gibson (1996). "Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: Evidence of genetic recombination." Acta Trop. (Basel) 61(1): 31-40.
- Bosseno, M. F., J. Telleria, et al. (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(3): 275-82.
- Bougnoux, M. E., S. Morand and C. d'Enfert (2002). "Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*." J. Clin. Microbiol. 40(4): 1290-1297.
- Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, Noireau F (1995). Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg 53 (2):179-84.

- Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, Tibayrenc M (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. Exp Parasitol 89(3):285-95.
- Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, Tibayrenc M, Noireau N, 2012 Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. Plos Negl. Trop. Dis. 6 (5): e1650.
- Breniere, S.F., Salas, R., Buitrago, R., Bremond, P., Sosa, V., Bosseno, M F., Waleckx, E., S. Depickere and Barnabé, C. (2013). Wild populations of *Triatoma infestans* are highly connected to intra-peridomestic conspecific populations in the Bolivian Andes. PLoS One 8 (11): e80786.
- Briones, M. R. S., R. P. Souto, B. S. Stolf and B. Zingales (1999). "The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity." Molecular and Biochemical Parasitology 104(2): 219-232.
- Brisse, S., C. Barnabé, A. L. Banuls, I. Sidibe, S. Noël and M. Tibayrenc (1998). "A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting." Mol. Biochem. Parasitol. 92(2): 253-263.
- Brisse, S., J. C. Dujardin and M. Tibayrenc (2000). "Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers." Mol. Biochem. Parasitol. 111(1): 95-105.
- Brisse, S., J. Henriksson, C. Barnabé, E. J. Douzery, D. Berkvens, M. Serrano, M. R. De Carvalho, G. A. Buck, J. C. Dujardin and M. Tibayrenc (2003). "Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype." Infect. Genet. Evol. 2(3): 173-183.
- Britto, C., M. A. Cardoso, P. Wincker and C. M. Morel (1993). "A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz 88(1): 171-172.
- Britto, C. C. (2009). "Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations." Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 122-135.
- Broutin, H., F. Tarrieu, M. Tibayrenc, B. Oury and C. Barnabé (2006). "Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*." Exp. Parasitol. 113(1): 1-7.

- Buitrago R., Waleckx E., Bosseno M.F., Zoveda F., Vidaurre P., Salas R., Mamani E., Noireau F. and Brenière F. 2010. First Report of widespread wild populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the valleys of La Paz-Bolivia. Am. J. Trop. Med. Hyg. **82** (4) 574-579.
- Carranza, J. C., H. M. Valadares, D. A. D'Avila, R. P. Baptista, M. Moreno, L. M. Galvao, E. Chiari, N. R. Sturm, E. D. Gontijo, A. M. Macedo and B. Zingales (2009). "Trypanosoma cruzi maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil." Int J Parasitol.
- Carrasco, H. J., I. A. Frame, S. A. Valente and M. A. Miles (1996). "Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*." Am. J. Trop. Med. Hyg. **54**(4): 418-424.
- Carreño, H., C. Rojas, et al. (1987). "Schizodeme analyses of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Chile." Experimental Parasitology 64: 252-260.
- Cornish-Bowden, A. (1985). "Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984." Nucleic Acids Res 13(9): 3021-3030.
- Cortez, M. R., A. P. Pinho, P. Cuervo, F. Alfaro, M. Solano, S. C. Xavier, P. S. D'Andrea, O. Fernandes, F. Torrico, F. Noireau and A. M. Jansen (2006). "Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia." Exp Parasitol **114**(4): 305-313.
- Cortez MR, Emperaire L, Piccinali RV, Gürtler RE, Torrico F, Jansen AM, Noireau F. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia (2007). Acta Trop 102(1):47-54.
- de Freitas, J. M., L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V. F. Goncalves, S. M. Teixeira, E. Chiari, A. C. Junqueira, O. Fernandes, A. M. Macedo, C. R. Machado and S. D. Pena (2006). "Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*." PLoS Pathog **2**(3): e24.
- de Lana, M., A. da Silveira Pinto, C. Barnabé, V. Quesney, S. Noël and M. Tibayrenc (1998). "*Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*." Exp. Parasitol. **90**(1): 20-25.
- de Meeus, T. and F. Balloux (2004). "Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study." Infect Genet Evol 4(4): 345-351.
- Develoux, M., F. X. Lescure, G. Le Loup and G. Pialoux (2009). "Chagas disease." Rev Med Interne **30**(8): 686-695.
- Devera, R., O. Fernandes and J. R. Coura (2003). "Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(1): 1-12.

- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart and B. Andersson (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.
- Elias, M. C., N. Vargas, L. Tomazi, A. Pedroso, B. Zingales, S. Schenkman and M. R. Briones (2005). "Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to T. cruzi I and T. cruzi II types." Mol Biochem Parasitol **140**(2): 221-227.
- Excoffier, L. and G. Heckel (2006). "Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide." Nat Rev Genet **7**(10): 745-758.
- Excoffier, L. and H. E. Lischer (2010). "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." Mol Ecol Resour **10**(3): 564-567.
- Falla, A., C. Herrera, A. Fajardo, M. Montilla, G. A. Vallejo and F. Guhl (2009). "Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans." Acta Trop **110**(1): 15-21.
- Felsenstein, J. (1981). "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach." J. Mol. Evol. **17**(6): 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." Evolution **39**(4): 783-791.
- Fernandez-Villegas, A., M. J. Pinazo, C. Maranon, M. C. Thomas, E. Posada, B. Carrilero, M. Segovia, J. Gascon and M. C. Lopez (2011). "Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers." BMC Infect Dis **11**: 206.
- Ferreira, R. C. and M. R. Briones (2012). "Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains." Infect Genet Evol **12**(5): 1064-71.

- Flores-Chavez M, Bosseno MF, Bastrenta B, Dalenz JL, Hontebeyrie M, Revollo S, Brenière SF (2006). Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. Am J Trop Med Hyg **75**(3):497-501.
- Frank, F. M., M. M. Fernandez, N. J. Taranto, S. P. Cajal, R. A. Margni, E. Castro, V. Thomaz-Soccol and E. L. Malchiodi (2003). "Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved." Parasitology **126**: 31-39.
- Franzen, O., S. Ochaya, E. Sherwood, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, M. A. Miles and B. Andersson (2011). "Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener." PLoS Negl Trop Dis **5**(3): e984.
- Galtier, N., M. Gouy and C. Gautier (1996). "SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." Comput. Appl. Biosci. **12**(6): 543-548.
- Gaunt, M. W., M. Yeo, I. A. Frame, J. R. Stothard, H. J. Carrasco, M. C. Taylor, S. S. Mena, P. Veazey, G. A. Miles, N. Acosta, A. R. De Arias and M. A. Miles (2003). "Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes." Nature **421**(6926): 936-939.
- Goudet, J. (1995). "FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics." J. Hered. **86**: 485-486.
- Guhl, F., N. Pinto and G. Aguilera (2009). "Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(4): 71-75.
- Herrera, C., M. D. BARGUES, A. Fajardo, M. Montilla, O. Triana, G. A. Vallejo and F. Guhl (2007). "Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia." Infect Genet Evol **7**(4): 535-539.
- Herrera, C., F. Guhl, A. Falla, A. Fajardo, M. Montilla, G. Adolfo Vallejo and M. D. BARGUES (2009). "Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences." J Parasitol Res **2009**.
- Herrera CP, Barnabé C, Brenière SF (2013). "Complex evolutionary pathways of the intergenic region of the mini-exon gene in *Trypanosoma cruzi* TcI: A possible ancient origin in the Gran Chaco and lack of strict genetic structuration". Infect Genet Evol. **16**: 27-37.
- Ienne, S., A. Pedroso, E. F. R. Carmona, M. R. Briones and B. Zingales (2010). "Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern." Infect Genet Evol **10**(5): 601-606.
- Jannin, J. and L. Villa (2007). "An overview of Chagas disease treatment." Mem Inst Oswaldo Cruz **102 Suppl 1**: 95-97.

- Judson, O. P. and B. B. Normark (1996). "Ancient asexual scandals." Trends in Ecology & Evolution 11(2): A41-A46.
- Kawashita, S. Y., G. F. Sanson, O. Fernandes, B. Zingales and M. R. Briones (2001). "Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution." Mol Biol Evol 18(12): 2250-2259.
- Krautz, G. M., J. C. Kissinger and A. U. Krettli (2000). "The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Today 16(1): 31-34.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei (2004). "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment." Brief Bioinform. 5(2): 150-163.
- Langella, O., 1999. Populations Version 1.2.30. Distributed by the author, CNRS UPR9034, France.
- Laurent, J. P., C. Barnabé, V. Quesney, S. Noël and M. Tibayrenc (1997). "Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*." Parasitology 114(Pt 3): 213-218.
- Lauthier, J. J., N. Tomasini, C. Barnabé, M. M. Rumi, A. M. D'Amato, P. G. Ragone, M. Yeo, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, M. A. Basombrio, M. A. Miles, M. Tibayrenc and P. Diosque (2012). "Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: Validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains." Infect Genet Evol 12: 350-358.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. Yeo, N. Acosta, M. W. Gaunt and M. A. Miles (2011). "Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids." PLoS Negl Trop Dis 5(10): e1363.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, et al. (2009). "Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids." Int J Parasitol 39(12): 1305-17.
- Lewicka K., Breniere-Campana SF., Barnabe C., Dedet JP., Tibayrenc M. (1995). An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. Exp Parasitol. 81(1):20-8.
- Librado, P. and J. Rozas (2009). "DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." Bioinformatics 25(11): 1451-1452.
- Lima, V. S., A. M. Jansen, et al. "Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region." Parasit Vectors 7: 263.

- Lisboa, C. V., S. C. Xavier, H. M. Herrera and A. M. Jansen (2009). "The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes." Vet Parasitol.
- Lozano –Kasten F., Magallón Gastélum E., Soto-Gutierrez M., Kasten-Monges M., Bosseno M, F., Brenière F., (2008). Conocimiento epidemiológico y situación actual de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México, *Salud Pública*, 50: 1-8.
- Luna-Marin, K. P., C. L. Jaramillo-Londono, J. Hernandez-Torres, R. Gutierrez-Marin, G. A. Vallejo and V. M. Angulo-Silva (2009). "ITS-RFLP- and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander, Colombia." Parasitol Res **105**(2): 519-528.
- Llewellyn, M. S., M. D. Lewis, N. Acosta, M. Yeo, H. J. Carrasco, M. Segovia, J. Vargas, F. Torrico, M. A. Miles and M. W. Gaunt (2009). "*Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease." PLoS Negl Trop Dis **3**(9): e510.
- Llewellyn, M. S., M. A. Miles, et al. (2009). "Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection." PLoS Pathog **5**(5): e1000410.
- Llewellyn, M. S., J. B. Rivett-Carnac, et al. (2011). "Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection." Int J Parasitol **41**(6): 609-14.
- Macedo, A. M. and S. D. J. Pena (1998). "Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease." Parasitology Today **14**(3): 119-124.
- Macedo, A. M., J. R. Pimenta, R. S. Aguiar, A. I. Melo, E. Chiari, B. Zingales, S. D. Pena and R. P. Oliveira (2001). "Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(3): 407-413.
- Machado, C. A. and F. J. Ayala (2001). "Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*." Proc. Natl Acad. Sci. USA **98**(13): 7396-7401.
- Machado, C. A. and F. J. Ayala (2002). "Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 33-47.
- Marcili, A., L. Lima, M. Cavazzana, A. C. Junqueira, H. H. Veludo, F. Maia Da Silva, M. Campaner, F. Paiva, V. L. Nunes and M. M. Teixeira (2009). "A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA." Parasitology **136**(6): 641-655.

- Mark Welch, D. B. and M. Meselson (2000). "Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers Without Sexual Reproduction or Genetic Exchange." Science 288(5469): 1211-1215.
- Mauricio, I. L., M. Yeo, M. Baghaei, D. Doto, F. Pratlong, E. Zemanova, J. P. Dedet, J. Lukes and M. A. Miles (2006). "Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD)." Int J Parasitol 36(7): 757-769.
- Menezes, C.A.S., Bittencourt, A.L., Mota, E.L.A., Sherlock, I., Ferreira, J. (1992) Avaliacao da parasitemia durante e após a gestacao em chagásicas crônicas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 25.
- Messenger, L. A., M. S. Llewellyn, T. Bhattacharyya, O. Franzen, M. D. Lewis, J. D. Ramirez, H. J. Carrasco, B. Andersson and M. A. Miles (2012). "Multiple Mitochondrial Introgression Events and Heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Maxicircle MLST and Next Generation Sequencing." PLoS Negl Trop Dis 6(4): e1584.
- Minning, T. A., D. B. Weatherly, et al. (2011). "Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization." BMC Genomics 12: 139.
- Miles, M. A., P. J. Toye, S. C. Oswald and D. G. Godfrey (1977). "The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71(3): 217-225.
- Morehouse, E. A., T. Y. James, A. R. Ganley, R. Vilgalys, L. Berger, P. J. Murphy and J. E. Longcore (2003). "Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone." Mol Ecol 12(2): 395-403.
- Momen, H. (1999). "Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature." Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 181-184.
- Moretti, E., Basso, B., Castro, I., Carrizo-Paez, M., Chaul, M., Barbieri, G., Feijoo, D.C., Sartori, M.J., Carrizo-Paez, R. (2005) Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38 (Suppl I): 53-55.
- Morel, C. M. and J. Lazdins (2003). "Chagas disease." Nature Reviews 1: 14-15.
- Munoz, M. J., L. Murcia and M. Segovia (2011). "The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease." Expert Rev Anti Infect Ther 9(1): 5-7.
- Moya, P., Villagra, L., Risco, J. (1979) Enfermedad de Chagas congénita Hallazgos anatomo-patológicos en placenta y cordón umbilical. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba) 37: 21-27.

- Murcia, L., B. Carrilero, D. Saura, M. A. Iborra and M. Segovia (2013). "[Diagnosis and treatment of Chagas disease]." Enferm Infecc Microbiol Clin **31 Suppl 1**: 26-34.
- Nogueira, N. and Z. Cohn (1976). "Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells." J Exp Med **143**(6): 1402-20.
- Nei, M. and W. H. Li (1979). "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5269-5273.
- Noireau, F., P. Diosque and A. M. Jansen (2009). "Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts." Vet Res **40** (2): 26.
- Noireau F., Flores R., Gutierrez T. and Dujardin J.P. 1997. Detection of *sylvatic* dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **92** 583-584.
- Ocana-Mayorga, S., M. S. Llewellyn, J. A. Costales, M. A. Miles and M. J. Grijalva (2010). "Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador." PLoS Negl Trop Dis **4** (12): e915.
- Organización Mundial de la Salud, Technical Reports Series 905. Ginebra: Suiza; 2002. p. 1-109
- Patterson JS, Guhl F. Telleria J, Tibayrent M. American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. Elsevier; London: 2010. Geographical distribution of Chagas disease; pp. 83–114
- Panzer F, Ferreiro MJ, Pita S, Calleros L, Pérez R, Basmadján Y, Guevara Y, Brenière SF, Panzer Y (2014). "Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers". Infect Genet Evol **27**:105-13.
- Pinto, A. S., M. de Lana, B. Bastrenta, C. Barnabé, V. Quesney, S. Noel and M. Tibayrenc (1998). "Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*." Parasitol Res **84** (5): 348-353.
- Posada, D. and K. Crandall (2001). "Simple (wrong) models for complex trees: a case from retroviridae." Mol Biol Evol **18**(2): 271-275.
- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." Lancet Infect. Dis. **1**(2): 92-100.
- Ramirez, L. E., E. Lages-Silva, F. Alvarenga-Franco, A. Matos, N. Vargas, O. Fernandes and B. Zingales (2002). "High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil." Acta Trop **84** (3): 189-198.
- Ramirez, J. D., F. Guhl, et al. (2012). "Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*." Mol Ecol **21**(17): 4216-26.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.

- Recommendations from a satellite meeting (1999). Mem Inst Oswaldo Cruz **94 Suppl 1**: 429-432.
- Revollo, S., B. Oury, J. P. Laurent, C. Barnabé, V. Quesney, V. Carriere, S. Noël and M. Tibayrenc (1998). "*Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties." Exp. Parasitol. **89** (1): 30-39.
- Richer, W., P. Kengne, et al. (2007). "Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes." Trop Med Int Health **12**(6): 759-64.
- Rougeron, V., T. De Meeus, S. Kako Ouraga, M. Hide and A. L. Banuls (2010). "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses." PLoS Pathog **6**(8): e1001004.
- Rozas, M., S. De Doncker, V. Adai, X. Coronado, C. Barnabé, M. Tibayrenc, A. Solari and J. C. Dujardin (2007). "Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment--length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications." J Infect Dis **195** (9): 1381-1388.
- Rozas, M., S. De Doncker, X. Coronado, C. Barnabé, M. Tibayrenc, A. Solari and J. C. Dujardin (2008). "Evolutionary history of *Trypanosoma cruzi* according to antigen genes." Parasitology **135**(10): 1157-1164.
- Ruvalcaba-Trejo, L. I. and N. R. Sturm (2011). "The *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10 strain maxicircle sequence: the third musketeer." BMC Genomics **12**: 58.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol. Biol. Evol. **4**(4): 406-425.
- Saravia, N. G., A. F. Holguin, R. E. Cibulskis and D. A. A (1987). "Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia." Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**(1): 59-69.
- Scharfstein, J., D. Andrade, E. Svensjo, A. C. Oliveira and C. R. Nascimento (2013). "The kallikrein-kinin system in experimental Chagas disease: a paradigm to investigate the impact of inflammatory edema on GPCR-mediated pathways of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." Front Immunol **3**: 396.
- Schmunis, G. A., F. Zicker, F. Pinheiro and D. Brandling-Bennett (1998). "Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America." Emerg Infect Dis **4**(1): 5-11.
- Schenone, H., Gaggero, M., Sapunar, J., Contreras, M. C., Rojas A. (2001) Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. report of two cases. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo **43**:231-232.
- Schofield CJ (1988). Biosystematics of the Triatominae. In MW Service, Biosystematics of Haematophagous Insects, Clarendon Press, Oxford, p. 284-312

- Schofield, C.J. (1994) *Triatominae, Biology & Control*. West Sussex, United Kingdom: Eurocommunica publications.
- Schofield, C. J., J. Jannin and R. Salvatella (2006). "The future of Chagas disease control." Trends Parasitol **22**(12): 583-588.
- Senior, K. (2007). "Chagas disease: moving towards global elimination." Lancet Infect Dis **7**(9): 572.
- Solari, A., A. Wallace, et al. (1998). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors." Exp Parasitol **89**(3): 312-22.
- Souto, R. P., O. Fernandes, A. M. Macedo, D. A. Campbell and B. Zingales (1996). "DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*." Mol. Biochem. Parasitol. **83**: 141-152.
- Sturm, N. R. and D. A. Campbell (2010). "Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop.
- Sturm, N. R., N. S. Vargas, S. J. Westenberger, B. Zingales and D. A. Campbell (2003). "Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*." Int. J. Parasitol. **33**(3): 269-279.
- Subileau, M., C. Barnabé, E. J. Douzery, P. Diosque and M. Tibayrenc (2009). "Trypanosoma cruzi: New insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes." Exp Parasitol.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." Molecular Biology and Evolution **28**(10): 2731-2739.
- Tavanti, A., N. A. Gow, S. Senesi, M. C. Maiden and F. C. Odds (2003). "Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*." J Clin Microbiol **41**(8): 3765-3776.
- Teixeira, A. R., R. J. Nascimento and N. R. Sturm (2006). "Evolution and pathology in chagas disease--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(5): 463-491.
- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demettree, Seveno M, Barnabe C, Ayala FJ, Tibayrenc M. (2010). Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA **107**(47): 20411-20416.
- Thomas, M. C., A. Fernandez-Villegas, B. Carrilero, C. Maranon, D. Saura, O. Noya, M. Segovia, B. Alarcon de Noya, C. Alonso and M. C. Lopez (2012). "Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology." Clin Vaccine Immunol **19**(2): 167-173.

- Tibayrenc, M., A. Hoffmann, O. Poch, L. Echalar, F. Le Pont, J. L. Lemesre, P. Desjeux and F. J. Ayala (1986). "Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **80**(3): 442-447.
- Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya and F. J. Ayala (1986). "Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure." Proc. Natl Acad. Sci. USA **83**(1): 115-119.
- Tibayrenc M, Breniere SF (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. Mem Inst Oswaldo Cruz.83 Suppl 1:249-55.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1988). "Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance." Evolution **42**(2): 277-292.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg and F. J. Ayala (1990). "A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **87**(7): 2414-8.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1991). "Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa." Parasitol. Today 7(9): 228-232.
- Tibayrenc, M. (1995). "Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci." C. R. Acad. Sci. III **3185**(112): 135-139.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1999). "Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*." Microbes and Infection 1(6): 465-472.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (2012). "Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Tibayrenc M, Ayala FJ (2013). How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? Trends Parasitol 29(6):264-9.
- Tomazi, L., S. Y. Kawashita, P. M. Pereira, B. Zingales and M. R. Briones (2009). "Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic." Genet Mol Res **8**(2): 458-476.
- Umezawa, E. S., A. M. Stolf, C. E. Corbett and M. A. Shikanai-Yasuda (2001). "Chagas' disease." Lancet **357**(9258): 797-799.
- Veas, F., G. Cuny, S. F. Brénière and M. Tibayrenc (1990). "Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop. (Basel) **48**(1): 79-82.

- Viotti, R., C. Vigliano, B. Lococo, G. Bertocchi, M. Petti, M. G. Alvarez, M. Postan and A. Armenti (2006). "Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial." *Ann Intern Med* **144**(10): 724-734.
- Waleckx E, Salas R, Huamán N, Buitrago R, Bosseno MF, Aliaga C, Barnabé C, Rodriguez R, Zoveda F, Monje M, Baune M, Quisberth S, Villena E, Kengne P, Noireau F, Brenière SF (2011). "New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations". *Infect Genet Evol* **11**(5):1045-57.
- Waleckx, E., S. Depickere, R. Salas, C. Aliaga, M. Monje, H. Calle, R. Buitrago, F. Noireau and S. F. Breniere (2012). "New discoveries of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) throughout the Bolivian Chaco." *Am J Trop Med Hyg* **86** (3): 455-458.
- Westenberger, S. J., C. Barnabé, D. A. Campbell and N. R. Sturm (2005). "Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*." *Genetics* **171**(2): 527-543.
- Westenberger, S. J., N. R. Sturm and D. A. Campbell (2006). "Trypanosoma cruzi 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids." *Int J Parasitol* **36**(3): 337-346.
- WHO (World Health Organization). 1991. *Control of Chagas' Disease: Report of a WHO Expert Committee*. Technical Report 811. Geneva: WHO
- World Health Organization, W. (1998) *Control of Chagas Disease*. Geneva.
- World Health Organization. Enfermedad de Chagas. 2002. Consultado el 24 de Junio del 2006. Disponible en: <http://www.who.int/ctd/chagas/index.ht>
- Wright, S. (1965). "The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating." *Evolution* **19**(3): 395-420.
- Yeo, M., I. L. Mauricio, L. A. Messenger, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, N. Acosta, T. Bhattacharyya, P. Diosque, H. J. Carrasco and M. A. Miles (2011). "Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(6): e1049.
- Zingales, B., M. A. Miles, D. A. Campbell, M. Tibayrenc, A. M. Macedo, M. M. Teixeira, A. G. Schijman, M. S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C. R. Machado, S. G. Andrade and N. R. Sturm (2012). "The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications." *Infect Genet Evol* **12**: 240–253.
- Zingales, B., B. S. Stolf, R. P. Souto, O. Fernandes and M. R. S. Briones (1999). "Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **94**: 159-164.

ANEXOS

Anexo 1: Código, localización, genotipos para los 5 locus nucleares de las 79 cepas aisladas de las seis poblaciones bolivianas de *T. cruzi* en estudio.

Código	Localización*	GP	GPI	LAP	GTP	PDH
LaPaz / Mecapaca / Tun1 / Mecapaca						
MEC095	id.	0404	0101	0304	0101	0106
MEC099	id.	0405	0101	0303	0101	0101
MEC101	id.	0405	0101	0303	0101	0101
MEC102	id.	0405	0101	0304	0101	0101
MEC103	id.	0404	0101	0304	0101	0104
MEC107	id.	0404	0101	0304	0101	0104
MEC161	id.	0404	0101	0304	0101	0104
MEC166	id.	0404	0101	0304	0101	0104
MEC170	id.	0405	0101	0303	0101	0101
MEC171	id.	0404	0101	0304	0101	0101
MEC173	id.	0404	0101	0303	0101	0101
LaPaz / Luribay / Luribay / Luribay						
LUR229	id.	0104	0101	0303	0201	0101
LUR237	id.	0104	0101	0303	0202	0000
LUR245	id.	0101	0101	0000	0101	0101
LUR250	id.	0101	0101	0000	0000	0000
LUR258	id.	0101	0101	0303	0201	0104
LUR265	id.	0404	0101	0000	0000	0000
LaPaz / Murillo / Sapini / Sap-Sap						
SAP203	id.	0101	0000	0303	0201	0101
SAP207	id.	0104	0101	0303	0202	0104
SAP223	id.	0101	0101	0303	0201	0505
SAP233	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP241	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP242	id.	0101	0000	0303	0201	0101
SAP242bis	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP243	id.	0101	0101	0303	0101	0101
SAP256	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP259	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP260	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP261	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP263	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP264	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP265	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP266	id.	0101	0101	0303	0401	0101
SAP267	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP270	id.	0101	0101	0303	0201	0505
SAP271	id.	0103	0101	0303	0202	0203
SAP272	id.	0101	0101	0000	0201	0101
SAP391	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP404	id.	0101	0101	0303	0201	0101

SAP405	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP445	id.	0101	0101	0303	0201	0203
SAP491	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP492	id.	0101	0101	0303	0201	0101
SAP500	id.	0101	0101	0000	0201	0101
LaPaz / Loayza / Cosiraya / sap-Cosi						
SAP302	id.	0101	0101	0303	0202	0401
SAP303	id.	0103	0101	0303	0202	0101
SAP304	id.	0103	0000	0303	0202	0101
SAP310	id.	0103	0101	0000	0202	0101
SAP312	id.	0101	0101	0000	0202	0101
SAP313	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP318	id.	0104	0101	0303	0202	0101
SAP319	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP321	id.	0101	0101	0303	0202	0104
SAP323	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP334	id.	0101	0101	0303	0202	0104
SAP336	id.	0101	0101	0303	0202	0101
SAP337	id.	0101	0101	0303	0202	0104
SAP346	id.	0101	0101	0303	0000	0104
SAP347	id.	0104	0101	0303	0202	0101
SAP348	id.	0101	0101	0000	0202	0000
SAP349	id.	0104	0101	0303	0202	0000
SAP372	id.	0203	0101	0303	0301	0000
SAP374	id.	0101	0101	0303	0000	0104
Cochabamba / Quillacollo / Villa Urkupiña / Qui-Urk						
QUI755	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI757	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI762	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI763	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI766	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI768	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI769	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI774	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI775	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI907	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI913	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI916	id.	0405	0102	0303	0201	0407
Cochabamba / Quillacollo / BSIA14T1 / Qui-Bsia						
QUI026	id.	0405	0102	0303	0000	0407
QUI027	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI053	id.	0405	0102	0303	0201	0407
QUI054	id.	0405	0102	0303	0000	0407

*Departamento / Municipalidad / Área / Población

Anexo 2. Significación de los test de desequilibrio de ligamiento entre pares de locus para las seis poblaciones de estudio.

Luribay					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	-	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	-	-	-	*	
<i>PDH</i>	-	-	-	+	*
Mecapaca					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	-	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	-	-	-	*	
<i>PDH</i>	-	-	+	-	*
Qui-Urk					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	+	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	+	+	-	*	
<i>PDH</i>	+	+	-	+	*
Qui-Bsia					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	-	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	-	-	-	*	
<i>PDH</i>	-	-	-	-	*
Sap-Sap					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	-	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	-	-	-	*	
<i>PDH</i>	+	-	-	-	*
Sap-Cosi					
	<i>GP</i>	<i>GPI</i>	<i>LAP</i>	<i>GTP</i>	<i>PDH</i>
<i>GP</i>	*				
<i>GPI</i>	-	*			
<i>LAP</i>	-	-	*		
<i>GTP</i>	+	-	-	*	
<i>PDH</i>	-	-	-	+	*

+ = test de desequilibrio de ligamiento significativo; - = test de desequilibrio no significativo

