



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis de la dinámica de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en las provincias de Manabí y Loja mediante la caracterización de subtipos de *Trypanosoma cruzi*

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

ALEJANDRA PATRICIA ZURITA LAGOS

Quito, 2011

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Alejandra Patricia Zurita Lagos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Jaime Costales

Director de Disertación

Quito, 24 de junio del 20110

A Odalys Samantta, Javiera Martina, Luis Gabriel V, para el bebé que está en camino y  
Ana

## AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a mi familia, en primer lugar a mi hija Odalys Samantta por su paciencia y comprensión durante todo el proceso. A mi padre Gabriel y mi madre Laura, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de este camino. A mi hermana Carolina y mi cuñado Cristian por acompañarme y ayudarme a solucionar los traspiés tecnológicos en la escritura de mi tesis. A mis amigas Yanara y Carina, por brindarme su palabras de aliento en los momentos claves, de tal forma que me permitieron llegar hasta aquí.

Agradezco al Doctor Mario Grijalva por haberme permitido desarrollar mi tesis, en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas. Al Doctor Jaime Costales por su guía y crítica constructiva, que me han permitido mejorar este documento. A mis compañeros y compañeras del CIEI: Rosita, Gaby, Caro, Josselyn, Andrea, Fer, Pedrito y voluntarios por su continuo interés y apoyo en los momentos más críticos de este camino.

Mi especial agradecimiento a Sofía Ocaña por ser una guía, una amiga, una compañera y una jefa que supo compartir conmigo su conocimiento y experiencia, que permitieron llevar a buen termino mi trabajo de tesis; a Anita Villacís por ser mi apoyo y mi amiga, a César Yumiseva por su soporte técnico y apoyo humano, a Esteban Baus por su preocupación constante en mi bienestar a lo largo del desarrollo de mi investigación.

Mi más sincera gratitud al personal del Instituto de Patología Experimental de la UNSa: Dr. Patricio Diosque, Nicolás, Meche, Anahí y Juan José; por compartir sus conocimientos y apoyo durante mi entrenamiento en Salta, Argentina. Al Dr. Bjorn Andersson por su colaboración en mi proyecto de tesis.

Agradezco a las personas de las comunidades de las provincias de Loja y Manabí; y al personal de SNEM que permitieron la obtención de las muestras necesarias para ejecutar el trabajo de mi tesis.

Reconozco el apoyo brindado a la Organización Mundial de la Salud, al Instituto Nacional de Salud (DMID/NIAD/NIH) de EEUU, Instituto de Enfermedades Tropicales de Ohio, EEUU, al proyecto Chagas Epinet de la Unión Europea, Children's Heartlink, EEUU, PLAN Internacional, Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENECYT), Ministerio de Salud Pública del Ecuador a través del Programa de Control y Vigilancia de la Enfermedad de Chagas, al Instituto de Parasitología Experimental, UNSa, Salta, Argentina y al Instituto Karolinska de Suecia, que son aquellas instituciones que con su colaboración permitieron llevar a buen fin esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XIII
LISTA DE ANEXOS .....	XV
1 RESUMEN.....	1
2 ABSTRACT .....	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	3
3.2 TRATAMIENTO.....	6
3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
3.3.1 FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	8
3.3.2 DIVERSIDAD GENÉTICA .....	9
3.4 MARCADORES MOLECULARES DE LOS LINAJES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	11
3.4.1 PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP) Y GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI).....	12
3.4.2 GENES RIBOSOMALES.....	13
3.4.3 IDENTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE <i>Trypanosoma cruzi</i> I POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS, MLST (“Multilocus Sequence Typing”) .....	13
3.4.4 GENES EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS.....	14

3.5	<i>Trypanosoma rangeli</i> .....	15
3.6	JUSTIFICACIÓN .....	15
3.7	OBJETIVOS .....	16
3.7.1	OBJETIVO GENERAL .....	16
3.7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
4.1	ÁREA DE ESTUDIO .....	18
4.2	COLECCIÓN DE TRIATOMINOS .....	18
4.3	AISLAMIENTO DE PARÁSITOS DE TRIATOMINOS .....	19
4.4	COLECCIÓN DE MAMÍFEROS .....	20
4.5	ANÁLISIS PARASITOLÓGICO DE MAMÍFEROS .....	21
4.6	OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE PARÁSITOS .....	21
4.7	EXTRACCIÓN DE ADN .....	23
4.8	CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
4.8.1	AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>24S<math>\alpha</math></i> ARN .....	23
4.8.2	AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>hsp60</i> Y <i>gpi</i> .....	24
4.8.3	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	25
4.9	DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS AISLADOS ECUATORIANOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> I POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS .....	26
4.9.1	EDICIÓN DE CROMATOGRAMAS Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ...	26

4.9.2 VARIBIALIDAD DE LOS GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS .....	27
4.9.3 DENDROGRAMAS FILOGENÉTICOS .....	28
5 RESULTADOS .....	30
5.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
5.2 TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS DE AISLADOS DEL LINAJE <i>Trypanosoma cruzi I</i> .....	30
5.2.1 DIFICULTAD EN LOS ANÁLISIS DE CROMATOGRAMAS .....	31
5.2.2 VARIABILIDAD DE CADA GEN.....	32
5.2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA DE DIEZ GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS.....	32
5.2.4 VARIBIALIDAD EN LOS GENES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	33
5.2.5 DINÁMICA DE LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN DE <i>Trypanosoma cruzi I</i> .....	34
6 DISCUSIÓN.....	36
6.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
6.2 TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS DEL LINAJE <i>Trypanosoma cruzi I</i> .....	38
6.2.1 DIFICULTAD EN LOS ANÁLISIS DE LOS CROMATOGRAMAS.....	38
6.2.2 VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS .....	39
6.2.3 LA DINÁMICA DEL LINAJE <i>Trypanosoma cruzi I</i> EN EL ECUADOR.....	41
7 CONCLUSIONES.....	46

8	LITERATURA CITADA.....	47
9	FIGURAS.....	54
10	TABLAS.....	76
11	ANEXOS.....	102

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo.....	55
Figura 2. Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	57
Figura 4. Ubicación geográfica de las comunidades de donde se obtuvieron aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> en la provincia de Loja.....	58
Figura 5. Ubicación geográfica de las comunidades de donde se obtuvieron aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> en la provincia de Manabí.....	59
Figura 6. Esquema para la caracterización de linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	60
Figura 7. Representación de sitios heterocigotos o ambiguos.....	61
Figura 8. Alineamiento de cepas ecuatorianas. ....	62
Figura 9. Amplificación del gen <i>24Sa</i> rARN de cultivos clonales de <i>T. cruzi</i> .....	63
Figura 10. Amplificación del gen <i>hsp60</i> de cultivos clonales de <i>T. cruzi</i> .....	63
Figura 11. Amplificación del gen <i>gpi</i> de cultivos clonales de <i>T. cruzi</i> . ....	64
Figura 12. Representación de picos de un cromatograma que cumple los parámetros para una correcta interpretación.....	65
Figura 13. Representación de picos sobrepuestos de un cromatograma. ....	66
Figura 14. Cromatograma con un sitio heterocigoto. ....	67
Figura 15. Representación de picos anchos de un cromatograma.....	68
Figura 16. Cromatograma sin ruido de fondo. ....	69
Figura 17. Cromatograma con ruido de fondo. ....	70
Figura 18. Efecto del alineamiento de secuencias con ruido de fondo.....	71

Figura 19. Dendrograma de cepas referencia (TcI-TcVI), cepas TcI argentinas y ecuatorianas.....	72
Figura 20. Dendrograma de los aislados TcI de Argentina y Ecuador.....	73
Figura 21. Dendrograma con las cepas de la provincia de Loja.....	74
Figura 22. Dendrograma correspondiente a las cepas de la provincia de Manabí. ....	75

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la nueva nomenclatura con las clasificaciones generadas por la información proporcionada por diferentes marcadores .....	77
Tabla 2. Genes “housekeeping” y su función, correspondientes al esquema de la tipificación de secuencias de multilocus de <i>Trypanosoma. cruzi</i> .....	78
Tabla 3. Información geográfica de las comunidades de las provincias de Loja y Manabí, de donde provienen las muestras analizadas en este estudio .....	79
Tabla 4. Lista de los genes, primer y secuencias utilizados para la tipificación mediante secuenciación de multilocus (MLST) .....	80
Tabla 5. Clave de representación de los nucleótidos, por letra y color.. .....	81
Tabla 6. Resultado de la caracterización de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> de las provincias de Loja y Manabí.....	82
Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí.....	85
Tabla 8. Resumen del proceso de obtención y selección de muestras en este estudio .....	90
Tabla 9. Variabilidad correspondiente a los diez genes de la tipificación de secuencias de multilocus utilizados en este estudio.....	94
Tabla 10. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>coar</i> .....	95
Tabla 11. Tabla 11. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>gp</i> .....	96
Tabla 12. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>gpi</i> .....	96
Tabla 13. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>gtp</i> .....	96
Tabla 14. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>pdh</i> .....	97
Tabla 15. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>rl-gtp</i> .....	98
Tabla 16. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>sttp-frag2</i> .....	98

Tabla 17. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen <i>tcsodb</i> .....	99
Tabla 18. Posiciones dentro de las secuencias de cada gen que presentan sitios homocigotos y heterocigotos .....	99
Tabla 19. Información de los perfiles alélicos y secuencias diploides tipo de cada uno de los genes usados en los análisis filogenéticos .....	100
Tabla 20. Número de muestras analizadas por provincia .....	101

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1. Preparación de medio de cultivo “liver infusion triptose”, LIT para cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	103
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo bifásico para aislamiento de cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	104
Anexo 3. Preparación de medio de cultivo agar sangre para clonación de cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	107
Anexo 4. Procedimiento para el conteo de parásitos en la cámara de Neubauer .....	108

## 1 RESUMEN

El protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas (ECh), presenta una alta variabilidad genética. Existen seis linajes de *T. cruzi*, denominados TcI a TcVI. En este estudio se analizaron aislados provenientes de las provincias de Loja y Manabí, y se encontró que el linaje predominante es TcI. La variabilidad de TcI fue analizada mediante Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST), empleando un panel de 7 genes (*coar*, *pdlh*, *rl-gtp*, *sttp-frag2*, *gp*, *tcsodb*, *tcosda*), que en combinación produjeron buen poder discriminatorio (DP=1). En ambas provincias, el análisis permite distinguir dos poblaciones, una conformada predominantemente por parásitos provenientes de hospederos colectados en el hábitat de domicilio-peridomicilio y la otra conformada predominantemente con los del hábitat silvestre. Nuestros resultados sugieren que existe un flujo genético limitado entre las dos poblaciones. Estos resultados indican que los ciclos de transmisión del parásito tienen un importante impacto en la divergencia genética en las poblaciones tanto de Manabí y como de Loja, y que posiblemente los hospederos (reservorios y vectores) jueguen un rol importante en la dispersión de *T. cruzi* entre los ciclos de transmisión domiciliar-peridomicilar y silvestre. Todos estos factores deben tomarse en cuenta para desarrollar medidas de control para la ECh, en el Ecuador.

Palabras claves: ciclos de transmisión, domicilio, Enfermedad de Chagas, medidas de control, MLST, peridomicilio, silvestre y Tc I.

## 2 ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas disease (ECh), is highly genetically heterogeneous. Six lineages of *T. cruzi* exist, denominated TcI-TcVI. In this study, isolates from the provinces of Loja and Manabí in Ecuador were analyzed, and it was determined that the predominant lineage is TcI. The variability within TcI was analyzed using Multilocus Sequences Typing (MLST) with seven genes, which combined produced good discriminatory power (DP=1). In both provinces, the analysis allowed to distinguish two populations, one composed predominantly by parasites from hosts collected in the domestic-peridomestic habitats and the other composed predominantly by hosts collected within the sylvatic habitat. Our results indicate that limited genetic flow exists between the two populations. These results suggest that the transmission cycles of the parasite have an important impact in the genetic divergence in the populations of both Manabí and Loja, and that possibly the hosts (reservoirs and vectors) play an important role in the dispersion of *T. cruzi* between the domestic-peridomestic and sylvatic transmission cycles. All these factors should be taken into account in order to develop effective control measures for ECh in Ecuador.

Keywords: transmission cycles, domestic, Chagas disease, measures of control, MLST, peridomestic, sylvatic and TcI.

## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana, es causada por *Trypanosoma cruzi* y ocasiona grandes problemas económicos y de salud pública en los países de América Latina (Miles *et al.*, 2003). Su distribución se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina (Moncayo y Silveira, 2009). Sin embargo, el reporte de casos no se limita a la zona endémica y varios pacientes han sido reportados en países no endémicos (Figura 1). En Ecuador, la ECh fue reportada en 1930, y se estima que actualmente existen alrededor de 200.000 personas contagiadas, mientras que aproximadamente tres millones se encuentran en riesgo de ser infectadas (Aguilar *et al.*, 1999; WHO, 2002).

Originalmente, *T. cruzi* infectaba únicamente a animales silvestres y era transmitido por insectos hematófagos en áreas silvestres. Sin embargo, a consecuencia de la colonización y deforestación causadas por el hombre, tanto los seres humanos como los animales domésticos pasaron a ser fuente de alimentación de los vectores (Briceño-León, 2009; Coura, 2007).

La enfermedad de Chagas presenta varias formas clínicas (asintomática, cardíaca y digestiva) cuya ocurrencia dependen de factores que no están totalmente definidos. Entre dichos factores están la variación genética del parásito y la respuesta inmune del hospedero (Macedo *et al.*, 2004; Manoel-Caetano y Silva, 2007).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar dos fases: una fase inicial o aguda y una fase crónica.

La fase aguda se caracteriza por la presencia de parásitos circulando en la sangre y dura entre cuatro a ocho semanas (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006). Los síntomas pueden incluir fiebre, falta de apetito, taquicardia o arritmias, conjuntivitis e inflamación en el área de la picadura del insecto. Otros síntomas, menos frecuentes, son la miocarditis y la meningoencefalitis (López-Atuñano *et al.*, 2000). Durante esta fase, del dos al ocho por ciento de personas infectadas mueren, especialmente los niños (Coura y De Castro, 2002), aunque también hay casos de pacientes que presentan parasitemia mas no síntomas (Miles *et al.*, 2003). La principal forma de diagnóstico en esta fase es la detección de los parásitos, mediante microscopia directa, en sangre. Otras técnicas utilizadas son el xenodiagnóstico, cultivos de sangre y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006).

Cuando los síntomas de la fase aguda desaparecen, la persona infectada inicia la fase crónica de la enfermedad, la cual dura toda la vida. Esta fase se caracteriza por la ausencia de síntomas y una baja cantidad de parásitos circulantes en la sangre (López-Atuñano *et al.*, 2000). Durante la fase crónica, las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad son la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero y la obtención de parásitos mediante cultivos con la sangre de personas infectadas, aunque esta última presenta dificultades (Miles *et al.*, 2003). Esta fase tiene cuatro formas clínicas, que se detallan a continuación.

La forma indeterminada de la enfermedad se caracteriza por la ausencia de síntomas y lesiones en los órganos del cuerpo (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006). Del 50-70% de las personas infectadas que se encuentran en la forma indeterminada, pueden permanecer en esta fase muchos años o toda su vida, sólo un 10 a 40% de los pacientes, después de un tiempo, desarrollan lesiones típicas de la fase crónica (WHO, 2002).

La forma cardíaca de la enfermedad es la forma crónica más común. Incluye una amplia variedad de daños en el corazón y generalmente se presenta después de 20 años de ocurrida la fase aguda (WHO, 2002). La cardiomiopatía chagásica posee algunas características que la pueden diferenciar de problemas cardíacos con otro origen. Los síntomas para esta condición incluyen la presencia de arritmias, miocarditis, insuficiencia cardíaca, aneurismas, dilatación de la cavidad ventricular, problemas en la contracción miocárdial principalmente de la pared postero-inferior y ápice del ventrículo izquierdo y trombosis (Coura, 2007; Gascón *et al.*, 2007). La tasa de mortalidad de personas en fase crónica que presentan problemas cardíacos es de 27% aproximadamente (Manoel-Caetano y Silva, 2007).

La forma digestiva de la enfermedad de Chagas se caracteriza por daños que ocurren principalmente en el esófago y el colon, los cuales presentan anomalías en su tamaño, produciéndose disfagia y estreñimiento (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006). Alrededor de un 6% de las personas infectadas y que se encuentran en fase crónica desarrollan problemas digestivos (Manoel-Caetano y Silva, 2007).

Existen también alteraciones a nivel del sistema nervioso periférico provocadas por la ECh que ocurren en casi un 10% de pacientes en la fase crónica. En este caso se presentan daños que producen dificultades sensoriales y coordinación a nivel de los miembros del cuerpo, como es el caso de la pérdida o disminución de sensaciones táctiles o de dolor, además de movimientos sin control de los tendones (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006; WHO, 2002).

### 3.2 TRATAMIENTO

En la actualidad existen dos medicamentos que son utilizados para el tratamiento de la ECh, como el nifurtimox y el benznidazol. Estas dos drogas son efectivas en el tratamiento de la fase aguda, en la transmisión congénita y en pacientes que se encuentran en la fase crónica temprana, como es el caso de niños menores de 12 años (Moncayo y Ortiz-Yanine, 2006; Coura y De Castro, 2002).

En lo que se refiere a pacientes en la fase crónica de la ECh, se han estudiado los efectos de estos dos medicamentos, obteniéndose resultados poco satisfactorios, ya que los pacientes tratados, a pesar de presentar una relativa reducción en la cantidad de anticuerpos contra *T. cruzi*, no presentan una clara evidencia de cura de la infección. Además el uso prolongado de estos medicamentos produce efectos secundarios como neuropatías, problemas digestivos y de la piel entre otros. Esto significa que, en la actualidad, no existe un medicamento efectivo para la fase crónica de la ECh (Reyes y Vallejo, 2009). Sin embargo, un estudio que evalúa la conveniencia de tratar a pacientes que sufren cardiopatía chagásica crónica con benznidazol se está llevando a cabo y el objetivo principal es determinar si el tratamiento continuo con este medicamento disminuye la carga parasitaria en el paciente y en consecuencia los daños al tejido cardíaco (Marin-Neto *et al.*, 2009).

### 3.3 *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un protozoo flagelado que pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida (Guzmán-Marín *et al.*, 1999). Este parásito es intracelular, a diferencia de otras especies de tripanosomas. Al igual que otros parásitos del orden

kinetoplastida, posee una sola mitocondria en cuyo interior se encuentra el kinetoplasto que es un organelo que contiene ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (kADN) (Roberts y Janovy, 2005) (Figura 2).

El ciclo de vida de *T. cruzi* comprende distintos estadios morfológicos, los cuales infectan dos tipos diferentes de hospederos: insectos triatominos y mamíferos reservorios, entre estos últimos el ser humano (Coura y De Castro, 2002). Cuando los triatominos ingieren sangre de mamíferos que contiene tripomastigotes sanguíneos, adquieren los parásitos. Cuando los parásitos llegan al intestino medio del vector, se transforman en epimastigotes, que son la forma reproductiva del ciclo de vida. Una vez que los parásitos llegan al recto, se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que es la forma infectiva para el hospedero vertebrado (Figura 3).

Cuando un triatomino infectado se alimenta de la sangre de un mamífero, deposita heces que contienen los tripomastigotes metacíclicos, los cuales pueden ingresar al vertebrado a través de abrasiones en la piel o las membranas mucosas. Los tripomastigotes invaden las células de diferentes tejidos del vertebrado hospedero y se transforman en amastigotes, los cuales se reproducen en el interior de las células. Posteriormente, cuando los parásitos que se transforman nuevamente en tripomastigotes salen de la célula infectada hacia el torrente sanguíneo (Calderón, 2001) (Figura 3).

La transmisión de *T. cruzi* es compleja e involucra dos tipos de hospederos: insectos triatominos que son los vectores del parásito y mamíferos que constituyen los reservorios de los parásitos. La circulación del parásito en el ambiente se lleva a cabo dentro de tres ciclos de transmisión: (a) en el ciclo doméstico, el parásito circula entre vectores que se han adaptado a vivir en el interior de las casas, siendo los humanos y los animales domésticos la principal fuente de alimento; (b) en el ciclo peridoméstico, la transmisión se produce por vectores que no se han adaptado a los ambientes domiciliarios,

pero que sin embargo pueden vivir en los alrededores de las viviendas humanas, siendo su principal alimento mamíferos sinantrópicos como ratas y raposas y animales domésticos y, (c) en el ciclo silvestre, los parásitos circulan entre mamíferos y vectores silvestres, generalmente en zonas en donde no hay alteraciones en el ambiente, causados por la intervención humana. (Molina-Garza *et al.*, 2007). La interrupción de estos tres ciclos de transmisión se complica debido a que existen más de 130 especies de triatomíneos que se encuentran en el continente americano (Miles *et al.*, 2003).

### 3.3.1 FORMAS DE TRANSMISIÓN

La principal vía de contagio de *T. cruzi* al ser humano es la transmisión vectorial, que se da por las heces infectadas de los triatomíneos, las cuales al entrar en contacto con las membranas mucosas o la piel lastimada permiten el ingreso del parásito al torrente sanguíneo (Miles *et al.*, 2003). Otras formas de transmisión incluyen transfusiones de sangre; trasplante de órganos; de forma congénita de madre a feto debido a que *T. cruzi* puede atravesar la placenta; por accidentes de laboratorio con agujas contaminadas (Dias y Schofield, 1999; Coura y De Castro, 2002; Sánchez *et al.*, 2005; Coura, 2007) y en los últimos años se han realizado reportes de transmisión oral que se produce al ingerir alimentos contaminados con las heces de triatomíneos o por consumir carne cruda de animales silvestres (Nóbrega *et al.*, 2009). Una forma de transmisión de la ECh, tal vez la menos común, es la migración de las personas desde países donde la ECh es endémica, hacia países donde no se registra la presencia de los vectores (WHO, 2010) (Figura 1b).

### 3.3.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

La estructura poblacional de *T. cruzi* es compleja y comprende una variedad de linajes, los cuales se caracterizan por presentar una gran heterogeneidad tanto en su fenotipo como en su genotipo (Herrera *et al.*, 2007; Miles *et al.*, 2003). Parte de esta diversidad se ha podido encontrar realizando análisis de isoenzimas; estos estudios han permitido definir la presencia de tres grupos a los cuales se les denominó zimodemos (Miles *et al.*, 1977, 1978). Según esta división, el zimodemo 1 (Z1) y el zimodemo 2 (Z2) fueron determinados como las dos subdivisiones principales, mientras el zimodemo 3 (Z3) es un grupo, que a ese nivel de análisis, no estaba claramente definido (Gaunt y Miles, 2000). Se propuso que el Z1 y Z3 están asociados con el ciclo silvestre, donde Z1 se relacionaría con los hábitats de palmas y Z3 con hábitats terrestres, como las madrigueras de mamíferos pequeños. Por otro lado, Z2 se lo asocia con el ciclo doméstico, ya que se aisló de pacientes y animales domésticos (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Gaunt y Miles, 2000). Esto puede variar dependiendo de la zona, ya que en algunos países, como Panamá y Colombia, se ha evidenciado aislados de Z1 que presentan una relación con el ciclo doméstico (Cuervo *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2006). A pesar de que estos estudios brindaron una noción general sobre la diversidad de *T. cruzi*, su alta variabilidad fue determinada con el uso de herramientas moleculares más específicas para el análisis de ácido ribonucleico (ARN) ribosomal, mini-exón, el fingerprinting del ADN, análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del kADN, análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), electroforesis de enzimas de multilocus (MLEE) entre otros (Souto *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2001; Diosque *et al.*, 2003; Devera *et al.*, 2003; Barnabé *et al.*, 2005). En base a estos estudios, se determinó que el zimodemo 1 corresponde al linaje *T. cruzi* I (TcI) y el zimodemo 2 al linaje *T. cruzi*

II (TcII), de este manera se unificaron los términos que hacen referencia a estas dos grandes subdivisiones (Miles *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios posteriores que incluyen una mayor diversidad de muestras, evidenciaron la presencia de una variabilidad intrínseca mayor y se identificaron seis DTUs (“Discrete Typing Units”), se llaman así a los grupos que se forman, dentro de una especie, que comparten características específicas (Brisse *et al.*, 2000), y son: DTU I (Z1) y cinco subgrupos dentro de *T. cruzi* II (DTU II), los cuales fueron denominados DTU IIa-e (Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2001). Otros estudios revelaron que al menos dos de los linajes identificados corresponden a híbridos (DTU IId y DTU IIE). Para unificar la nomenclatura utilizada para definir estos linajes se realizó una reunión de expertos en el tema en la que se decidió nombrar a los linajes como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009) (Tabla 1).

La dinámica de estos linajes aún se encuentra bajo estudio, sin embargo se ha determinado que TcI presenta una amplia distribución, desde Estados Unidos hasta Argentina, y una alta variabilidad que, posiblemente, está determinada por su relación con sus hospederos (O’Connor *et al.*, 2007), en el caso de los mamíferos se lo ha relacionado con *Didelphis* y con los vectores de la tribu Rhodniini (Miles, 2009). Si bien este linaje tiene una amplia distribución, es predominante en el norte de América del Sur y está asociado con la cardiopatía chagásica (Miles *et al.*, 2009). En Ecuador, se ha reportado a TcI como el linaje predominante circulando tanto en vectores como en mamíferos en todos los ciclos de transmisión (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). En Colombia se ha reportado la existencia de variantes dentro de TcI (Herrera *et al.*, 2007). Estas variantes se han denominado TcI a-d y se ha postulado que tienen asociaciones con diferentes tipos de ciclos: Ia se encuentra relacionado con el ciclo doméstico y vectores domiciliados, Ib asociado al ciclo doméstico y peridoméstico, Ic vinculado con el ciclo peridoméstico y el

Id se lo ha relacionado con ambientes silvestres (Falla *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2007, 2009).

En lo que respecta a los demás linajes o DTUs, sus asociaciones con ecótopos específicos aún no han sido claramente definidas. En lo que se refiere a DTU IIa (TcIV), se conoce muy poco, ya que es difícil diferenciarlo del DTU IIc (TcIII) pero se ha confirmado que se trata de uno de los productos de hibridización entre TcI y TcII. Sus hospederos no han sido claramente definidos, sin embargo, se lo ha aislado de armadillos, primates, zarigüeyas e insectos del género *Rhodnius*, lo cual sugiere una distribución sobrepuesta a TcI. El DTU IIc (TcIII) no es común en el ciclo doméstico y se lo ha relacionado con armadillo y con roedores terrestres. Además se ha logrado aislar este linaje de perros, sin embargo no se ha logrado aislarlo de pacientes con la ECh. Los DTUs IIb (TcII), IIc (TcV) y IIe (TcVI) son los linajes principales de países del Cono Sur y del Gran Chaco. Estos linajes han sido relacionados al ciclo doméstico y a los vectores del género *Panstrongylus* y *Triatoma* (Miles *et al.*, 2009). Además, han sido aislados de casos severos de la ECh, donde la principal característica es la presencia de los megasíndromes (Miles, 2009). Adicionalmente, el DTU IIc se lo ha relacionado con la transmisión congénita (Miles *et al.*, 2009).

### **3.4 MARCADORES MOLECULARES DE LOS LINAJES DE *Trypanosoma cruzi***

Debido a la alta diversidad genética de *T. cruzi*, los métodos para la detección de la misma son muy variados, lo que ha causado también una nomenclatura amplia y diferente, dependiendo del marcador molecular usado. En muchos casos esto ha dificultado la comparación de resultados y la estandarización de metodologías.

En el 2009, Lewis *et al.* propusieron realizar la caracterización de los linajes de *T. cruzi* en base a la unión de los resultados de tres genes: *hsp60*, *gpi* y 24Sa. Con la estandarización de esta metodología se pueden identificar los seis linajes, actualmente reconocidos, para *T. cruzi*.

### 3.4.1 PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP) Y GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI)

Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas altamente conservadas que se encuentran en todos los organismos, cuya función se relaciona principalmente con la adaptación a cambios de temperatura y el mantenimiento de la homeostasis. Las HSP también se encuentran en condiciones celulares normales, en estos casos participan en el ensamblaje y degradación de otras proteínas (Folgueira y Requena, 2007). El gen *hsp60* ha sido utilizado para la identificación de los distintos linajes de *T. cruzi*, por ser altamente conservado y no presentar muchos productos no específicos durante la digestión enzimática (Lewis *et al.*, 2009).

El gen *gpi* codifica para la proteína de la glucosa fosfato isomerasa (GPI). Esta enzima participa en la glicólisis y gluconeogénesis, permitiendo la isomerización reversible de la glucosa a fructosa. Además, el gen *gpi* es importante, para los kinetoplástidos, porque permite obtener el adenosin trifosfato (ATP) necesario para los procesos biológicos (Cordeiro *et al.*, 2004). Al igual que el caso del *hsp60*, es un gen que presenta patrones definidos para identificar los diferentes DTUs de *T. cruzi*, después de la digestión enzimática (Lewis *et al.*, 2009).

### 3.4.2 GENES RIBOSOMALES

Los genes ribosomales son utilizados para establecer relaciones filogenéticas en diferentes organismos, y se caracterizan por ser marcadores moleculares con una velocidad de evolución lenta (Zingales *et al.*, 1999; Kawashita *et al.*, 2001). El ARNr de los tripanosomas está formado por la subunidad grande (24S) y la subunidad pequeña (18S), la primera posee dos ARN de alto peso molecular (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y 6 ARN pequeños. Estas dos subunidades están separadas por dos espacios transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) (Macedo *et al.*, 2004). Ambas subunidades han sido utilizadas para diferenciar los linajes y para establecer relaciones filogenéticas entre tripanosomas (Souto *et al.*, 1996, Kawashita *et al.*, 2001; Hughes y Piontkivska, 2003). Sin embargo, el gen 24S $\alpha$  ARNr, a pesar de ser bastante conservado, tiene el dominio divergente (D7) que se caracteriza por presentar dimorfismos que han sido utilizados para identificar los linajes de *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996; Stolf *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009).

### 3.4.3 IDENTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE *Trypanosoma cruzi* I POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS, MLST ("Multilocus Sequence Typing")

Actualmente existen varias técnicas moleculares que permiten determinar la variabilidad existente dentro de TcI, identificar las características epidemiológicas de sus variantes y las relaciones existentes entre o dentro de los aislados, sus formas de transmisión o las condiciones en las que se desarrolla la enfermedad (Bougnoux *et al.*, 2004; Urwin y Maiden, 2003). Sin embargo, las técnicas moleculares utilizadas actualmente para la detección de la diversidad presentan varias limitantes. Entre las más

importantes está la dificultad en la comparación de resultados por el uso de diferentes protocolos o la presencia de una diversidad mayor a la detectable con ciertos marcadores moleculares.

La tificación de secuencias de multilocus (MLST), utiliza los mismos principios básicos del MLEE en el sentido de que se examina la variación existente en las secuencias que se ha acumulado lentamente en la población. (Maiden *et al.*, 1998; Urwin y Maiden, 2003; Tavanti *et al.*, 2003). La MLST fue desarrollada y aplicada inicialmente en bacterias y se basa en la secuenciación de genes “housekeeping (Urwin y Maiden, 2003). El primer esquema de MLST que se desarrolló fue para *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). Posteriormente se han desarrollado varios esquemas de MLST para otras especies de bacterias, cuya información pueden ser compartida o comparada a través del internet (Bougnoux *et al.*, 2004).

Adicionalmente, esta técnica de caracterización ha sido desarrollada para organismos diploides, como es el caso de *Candida albicans* (Bougnoux *et al.*, 2002; Tavanti *et al.*, 2003), *Candida tropicalis* (Tavanti *et al.*, 2005) y *Leishmania donovani* (Mauricio *et al.*, 2006), logrando un alto grado de discriminación entre aislados. Por esta razón, la MLST ha sido utilizada en gran variedad de investigaciones, como es el caso de los estudios de poblaciones, brotes epidemiológicos e investigación clínica (Tavanti *et al.*, 2003).

#### 3.4.4 GENES EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS

Los genes “housekeeping” se los llama así porque son genes que se expresan en todas las células, ya que se encargan de controlar diferentes mecanismos necesarios para el

funcionamiento celular (Urwin y Maiden, 2003). Un grupo de 10 genes “housekeeping” que se están probado en aislados de *T. cruzi* (Lauthier *et al.* manuscrito en revisión) son: glutatión peroxidasa (*gp*), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (*coar*) componente E1 subunidad alfa del piruvato deshidrogenasa (*pdh*), proteína Rab 7 pequeña GTP-vinculado (*gtp*), proteína fosfatasa serina/treonina PP1 (*sttp-frag2*), proteína GTP-vinculadora tipo Rho (*rl-gtp*), glucosa- 6- fosfato isomerasa (*gpi*), superóxido dismutasa A (*tcsoda*) y superóxido dismutasa B (*tcsodb*), cuya función se resume en la Tabla 2.

### 3.5 *Trypanosoma rangeli*

Otro protozoo flagelado, que se puede encontrar en los triatominos, es *Trypanosoma rangeli*, el cual no es perjudicial para el hospedero vertebrado, pero causa la muerte de los triatominos (Mejía *et al.*, 2004). *T. rangeli* se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano, y su distribución se sobrepone con la de *T. cruzi* (Cuba Cuba, 1998; Mejía *et al.*, 2004). *T. cruzi* y *T. rangeli* tienen los mismos vectores y reservorios y se han evidenciado infecciones mixtas. Esto conlleva a que se den errores en el diagnóstico de la ECh, ya que pueden causar confusiones en la identificación de los parásitos por microscopía directa y un mal diagnóstico serológico debido a que se ha comprobado que ambos poseen antígenos comunes (Mejía *et al.*, 2004).

### 3.6 JUSTIFICACIÓN

Durante la última década, el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en el Ecuador ha avanzado considerablemente, debido a varias investigaciones sobre la biología tanto de los triatominos, mamíferos reservorios, seroprevalencia y aspectos

epidemiológicos (Grijalva *et al.*, 2003; Grijalva *et al.*, 2005a; Grijalva *et al.*, 2005b; Pinto *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2007; Villacís *et al.*, 2008). La información sobre los linajes de *T. cruzi* presentes en el país es escasa (Ocaña, 2010).

Este estudio trata de mejorar el conocimiento sobre los patrones de circulación de *T. cruzi* en los distintos ciclos de transmisión en las provincias de Loja y Manabí mediante el análisis molecular de los linajes del parásito que circulan en esas áreas. Estas provincias son endémicas para la ECh, y la información obtenida será un valioso aporte para el diseño e implementación de una estrategia de control efectiva para prevenir la ECh en estas provincias. Además, este estudio amplía la información sobre las provincias de Loja y Manabí que había sido previamente obtenida y publicada por el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010), mediante el uso de una muestra con mayor cobertura, una técnica de tipificación distinta (MLST) y la obtención de cultivos monoclonales.

### **3.7 OBJETIVOS**

#### **3.7.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar los patrones de circulación del linaje *Trypanosoma cruzi* I (TcI) en los ciclos de transmisión domiciliar, peridomiciliar y silvestre en las provincias de Loja y Manabí.

### 3.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar cultivos de TcI de vectores y mamíferos reservorios colectados en hábitats domiciliar, peridomiciliar y silvestre en las provincias de Loja y Manabí mediante el uso de medios de cultivo de infusión de hígado y triptosa (LIT) y bifásico.
2. Obtener cultivos monoclonales de los aislados de *T. cruzi* provenientes de diferentes hábitats de la provincia de Manabí mediante la técnica de clonación en placa con agar sangre.
3. Establecer la variabilidad genética de los parásitos del linaje TcI colectados en Loja y Manabí, mediante la técnica de tipificación de secuencias de multilocus (MLST).
4. Determinar la dinámica de los ciclos de transmisión con la información obtenida de los análisis moleculares.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 ÁREA DE ESTUDIO**

Los aislados analizados en este estudio vienen de dos fuentes: 69 muestras fueron aisladas previamente (Ocaña, 2010); mientras que 75 muestras nuevas fueron obtenidas de vectores y mamíferos colectados tanto en domicilio, peridomicilio y ambiente silvestre en las provincias de Loja y Manabí. En total, en Loja se incluyeron muestras provenientes de 12 comunidades en 6 cantones: Bramaderos, Chaquizhca, Coamine, Galápagos, Guara, Jurupe, La Ciénega, La Extensa, Sabanillas, San Jacinto, Santa Ester y Santa Rita (Figura 4 y Tabla 3). Mientras que en la provincia de Manabí las muestras fueron tomadas en un área que incluye 16 comunidades en 5 cantones: Chande, Cruz Alta, Danzarín, El Bejuco, Jesús María, La Ciénega, La Encantada, Liguíqui, Maconta Abajo, Mariscal Sucre, Moralito, Pimpiguasí, San Gabriel (Zapallo), San Gregorio y San Ramón (Figura 5 y Tabla 3).

### **4.2 COLECCIÓN DE TRIATOMINOS**

En cada unidad domiciliaria, se obtuvo el consentimiento informado por parte del jefe de familia, siguiendo procedimientos aprobados por los comités de ética de la Universidad de Ohio y de la PUCE. En las áreas de domicilio y peridomicilio se realizaron búsquedas activas de triatominos, con un esfuerzo de captura de una hora/hombre.

Para la colección de triatominos silvestres se hicieron búsquedas manuales dentro de cuadrantes de 600 x 600 metros ubicados en áreas silvestres. Los puntos de colección

fueron generados al azar en madrigueras, huecos de troncos y árboles, acumulaciones de vegetación, en nidos de mamíferos y aves (Suárez-Dávalos *et al.*, 2010).

Los triatomíneos colectados fueron identificados hasta el nivel de especie, en la Unidad de Entomología Médica del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la PUCE.

### **4.3 AISLAMIENTO DE PARÁSITOS DE TRIATOMINOS**

Adultos y ninfas de los triatomíneos colectados fueron examinados para determinar la presencia de tripanosomátidos. Los triatomíneos fueron sumergidos en la solución de White (HgCl<sub>2</sub> 0,8 mM; NaCl 111 mM; HCl concentrado 1,25 ml; Etanol 95% 250 ml; agua hasta completar 1L) por 10 minutos, para evitar la contaminación de las muestras durante el proceso de extracción. En un ambiente estéril, se obtuvieron muestras de contenido intestinal y/o heces. Estas muestras fueron diluidas en 200 µl de PBS (tampón salino de fosfato) estéril (NaCl 140 mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM,). Una alícuota de cada muestra se preservó a -20°C para una posterior extracción de ADN, una gota de la muestra fue colocada en un portaobjetos para realizar la revisión microscópica y determinar la presencia de flagelados; mientras que otra alícuota (aprox. 100 µl) fue inoculada en el medio de cultivo.

Las muestras de Loja y Manabí que fueron colectadas entre los años 2004 al 2008 fueron inoculadas en un tubo con 2 ml de medio de cultivo de infusión de hígado y triptosa (LIT) (“Liver Infusion Triptose”) (2,5% (p/v) infusión de hígado, 0,5% (p/v) triptosa, 68 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 56,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2% (p/v) dextrosa, 5% (v/v) suero fetal bovino (FBS), 0,025 mg/ml de hemina, penicilina/estreptomicina (0,1 mg/ml), gentamicina (0,05 mg/ml), pH 7,4) (Anexo 1).

Las muestras de Manabí colectadas durante los años 2009 y 2010 fueron aisladas en un medio de cultivo bifásico de agar sangre (1,4% (p/v) agar base sangre, 0,5% (v/v) tripticasa peptona, 0,5% agar (p/v), 0,6% NaCl (p/v), 10% (v/v) sangre desfibrinada, 0,15mg/ml gentamicina, 0,15mg/ml fluorocitosina) y 1ml de medio líquido (0,9% (p/v) NaCl, 0,15mg/ml gentamicina, 0,15mg/ml 5-fluorocitosina) (Anexo 2). En este caso, se inocularon 100 µl de contenido intestinal en cada tubo de cultivo. La presencia de parásitos en el medio de cultivo fue evaluada microscópicamente a los 15, 30 y 180 días post-inoculación.

#### **4.4 COLECCIÓN DE MAMÍFEROS**

Los micromamíferos fueron colectados mediante trampas Sherman (Sherman Co., Tallahassee, FL, USA) y Tomahawk (Tomahawk Life-traps Co., Tomahawk, WI, USA). Se muestrearon 3 hábitats diferentes: domicilio (en el interior de casas), peridomicilio (zonas aledañas a las viviendas en un radio de 50 metros) (Pinto *et al.*, 2006) y silvestre (que corresponde a la misma área de los cuadrantes utilizados para la búsqueda de triatomonimos selváticos).

Los criterios para escoger las viviendas muestreadas fueron: 1) aquellas viviendas en las cuales las búsquedas manuales detectaron infestación de triatominos y, 2) se trató de cubrir la mayor área de la comunidad, escogiendo las casas al azar. El promedio de esfuerzo de colección fue de 150 trampas/noche/comunidad, durante 5 días por cada localidad.

#### **4.5 ANÁLISIS PARASITOLÓGICO DE MAMÍFEROS**

Los animales capturados fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>, siguiendo los protocolos de IAUCC (Institucional Animal Care and Use Committee) de la Universidad de Ohio, USA. Se obtuvo una muestra de sangre por medio de una punción cardiaca. Aproximadamente, 200µl de esta sangre fueron colocados en crioviales con ácido etilendiaminotetraacético, EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ), para la posterior extracción de ADN. Una gota de la muestra fue colocada en un portaobjetos para su revisión microscópica y establecer la presencia de flagelados. En el caso de las muestras de Loja, se inoculó 1 ml de sangre en un vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ) con 10 ml de medio de cultivo LIT. Mientras que las muestras de Manabí fueron inoculadas (aprox. 100 µl) en cada tubo con cultivo bifásico. Los cultivos inoculados fueron revisados a los 15, 30 y 180 días. Aquellos cultivos que tuvieron crecimiento de parásitos, fueron mantenidos y clonados. Adicionalmente, se tomaron muestras de tejidos (corazón, hígado y músculo), que fueron almacenadas en alcohol al 90%.

#### **4.6 OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE PARÁSITOS**

Los cultivos obtenidos, tanto de triatomíneos como de mamíferos, fueron revisados por microscopía directa y subcultivados semanalmente. Los cultivos que presentaron más de 50 parásitos por campo fueron inoculados en tubos T25 (BD-Falcon, Franklin Lakes, NJ) para estabilizar la población de parásitos. De cada uno de los cultivos obtenidos se tomó una alícuota de 0,5 a 1 ml para extracción de ADN.

A finales del año 2009 se implementó la técnica de aislamiento de parásitos en cultivos bifásicos y la clonación en placas con agar sangre, por lo que únicamente las

muestras colectadas en Manabí 2009 y 2010 fueron clonadas. Para este proceso se siguió el protocolo propuesto por Yeo *et al.* 2007. El proceso de clonación es importante en el momento de realizar análisis moleculares, y como *T. cruzi* se caracteriza por presentar poblaciones multiclonales en la naturaleza, esto dificulta los resultados, ya que se podrían obtener diferentes genotipos de un mismo hospedero. Por esta razón, es preferible trabajar con clones, esto quiere decir que todos los parásitos de un aislado tendrán el mismo genotipo.

Para la clonación, se utilizó medios de cultivo agar sangre colocados en cajas petri (1,4% (p/v) agar base sangre, 0,5% (v/v) tripticasa peptona, 0,5% agar (p/v), 0,6% NaCl (p/v), 10% (v/v) sangre desfibrinada, 0,15mg/ml gentamicina, 0,15mg/ml 5-fluorocitosina) (Anexo 3). Para calcular el volumen de inoculación, se procedió al conteo del número de parásitos presentes en 10  $\mu$ l de cultivo en la cámara de Neubauer (Anexo 4). Se realizó el cálculo para determinar el volumen de inoculación que contenga  $1 \times 10^4$  parásitos/ $\mu$ l. Este volumen fue colocado en un tubo de cultivo que contenía agarosa de bajo punto de fusión, LMP (“Low melting point”) (Promega, Madison, WI) mantenida a 56°C en una proporción de 80% de cultivo y 20% de agarosa, se mezcló mediante inversión con movimientos suaves y se vertió el contenido en la placa petri. Cada placa fue sellada con parafilm para evitar la pérdida de humedad y se incubaron a temperatura ambiente.

La verificación del crecimiento de las colonias se realizó después de 15 y 30 días mediante inspección visual. Para la separación de clones se seleccionaron las colonias que presentaban una clara separación entre ellas. Bajo condiciones de esterilidad y con la punta de una pipeta pasteur estéril se separaron un total de cinco colonias de cada placa. Cada colonia fue inoculada en un cultivo bifásico y revisada cada 15 días para hacer un seguimiento del crecimiento. Adicionalmente, se obtuvo una alícuota de 0,5 a 1 ml de cada uno de los clones para extracción de ADN.

#### 4.7 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de las muestras obtenidas de heces y contenido intestinal de triatomíneos fueron extraídas siguiendo los protocolos del kit DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), mientras que para las muestras de sangre de mamíferos y cultivos se utilizó el kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). La concentración de ADN fue cuantificada en un Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y se obtuvo la información de absorbancia a 260 y 280 nanómetros.

#### 4.8 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

La determinación del linaje a la que pertenecen los aislados obtenidos fueron realizadas siguiendo el protocolo propuesto en Lewis *et al.*, 2009 utilizando los siguientes genes: *24Sα* ARN, *hsp60* y *gpi*. Un total de 69 muestras utilizadas para el análisis de este estudio habían sido previamente caracterizadas como TcI utilizando la misma metodología (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010), por lo que sólo 75 muestras fueron caracterizadas en este estudio.

##### 4.8.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *24Sα* ARN

Para la amplificación del *24Sα* rARN, se utilizó los siguientes primers: D71 (5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG-3') y D72 (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3') (Stolf *et al.*, 2003). La reacción se realizó en un volumen final de 15  $\mu$ l utilizando GoTaq®Green Master Mix (1X Green GoTaq®Reaction Buffer, 200mM de cada DNTPs, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, WI, USA), 20pM de cada primer y 1  $\mu$ l de ADN, en

un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Whaltham, MA, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 3 minutos (denaturalización), 29 ciclos compuestos por 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido por una extensión final de 72°C por 10 minutos (Lewis *et al.*, 2009). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 3% en tampón TAE 1X (0,79M Tris base; 0,4M acetato de sodio con tres moléculas de agua; 0,04M EDTA disódico), corridos a 70 voltios y teñidos con 1X SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y documentados en un sistema de imágenes BioDoc-it™ (UVP, Upland, CA, USA).

#### 4.8.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *hsp60* Y *gpi*

Para la amplificación de los genes *hsp60* y *gpi* se emplearon los primers: HSP60rev (5'-CGA GCA GCA GAG CGA AAC AT-3') y HSP60for (5'-GTG GTA TGG GTG ACA TGT AC-3') (Sturm *et al.*, 2003); para *gpi* los primers SO1(F) (5'-GGC ATG TGA AGC TTT GAG GCC TTT TTC AG-3') y SO2(R) (5'-TGT AAG GGC CCA GTG AGA GCG TTC GTT GAA TAG C-3') (Gaunt *et al.*, 2003).

La reacción se realizó en un volumen final de 20µl utilizando GoTaq®Green Master Mix (1X Green GoTaq®Reaction Buffer, 200 uM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 2 mM (*hsp60*) y 4 mM (*gpi*), 1U de *Taq* polimerasa) (Promega, Madison, WI, USA), 20 pM de cada primer y 1 µl de ADN.

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Whaltham, MA, USA) con las siguientes condiciones de amplificación:

***hsp60***: 94°C por dos minutos (denaturalización), 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) y extensión final a 72°C por 10 minutos.

*gpi* : 94°C por tres minutos (denaturalización), 27 ciclos (94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 3 minutos) y extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos obtenidos de la amplificación de los genes *hsp60* y *gpi* fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRV (Promega) y HhaI (Promega), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos del RFLP-PCR fueron corridos en tampón TAE 1X (0,79M Tris base; 0,4M acetato de sodio con tres moléculas de agua; 0,04M EDTA disódico) en geles de agarosa al 1,5% a 80 voltios, teñidos con 1X SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y documentados en un sistema de imágenes BioDoc-it™ (UVP, Upland, CA, USA).

#### 4.8.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para establecer el linaje correspondiente a cada muestra se utilizó el esquema que propone Lewis *et al.* 2009, en el cual se combina la información proveniente de los tres genes: *24Sα*, donde se obtendrá bandas de 110 a 125pb, dependiendo del linaje y los productos de digestión de los genes *gpi* y *hsp60*, los cuales presentarán un patrón de bandas específico (Figura 6). Adicionalmente, en cada corrida se amplificó ADN de cepas de referencia, además de un control negativo (con ADN de *T. rangeli*) y un control negativo sin ADN. El tamaño de las bandas de los productos de PCR fue estimado en base a la comparación con una escalera de referencia con bandas de pesos conocidos (100pb DNA Ladder, Promega).

#### **4.9 DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS AISLADOS ECUATORIANOS DE *Trypanosoma cruzi* I POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS**

Para determinar la variabilidad existente dentro del linaje TcI, se utilizó la técnica de MLST, para lo cual se realizó la secuenciación de 10 genes (Tabla 4), seleccionados de acuerdo a Lauthier *et al.* (manuscrito en revisión). El proceso de secuenciación se realizó con la colaboración del Dr. Bjorn Andersson, Profesor de Análisis Genómico del departamento de Biología Molecular y Celular del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia. Como resultado de la secuenciación se obtuvieron cromatogramas, los cuales fueron analizados, bajo supervisión del Dr. Patricio Diosque, en colaboración con el personal del Instituto de Patología Experimental de la Universidad Nacional de Salta (Argentina).

##### **4.9.1 EDICIÓN DE CROMATOGRAMAS Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS**

Para la edición de los cromatogramas se utilizó el programa Chromas Lite ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)). Se editó manualmente cada cromatograma, con la finalidad de corroborar y corregir sitios en donde no se haya registrado el nucleótido correspondiente debido a la presencia de artefactos propios del proceso de secuenciación. Cada nucleótido corresponde a un código de color determinado (Tabla 5). Debido a que se trabaja con secuencias provenientes de un organismo diploide, es posible encontrar sitios heterocigotos o ambiguos. Estos sitios se representan por la presencia de dos picos superpuestos (Figura 7). Estos sitios no son considerados por el programa Chromas Lite, que los representa con la letra N. En estos casos, la letra N fue

reemplazada manualmente por un nucleótido de acuerdo al código de ambigüedad nucleotídica de IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature - NC-IUB, 1986) (Tabla 5). Aquellos cromatogramas de los que no se pudo obtener información confiable, no fueron incluidos en el análisis.

Para realizar el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa SeaView (Galtier *et al.*, 1996). A partir de los cromatogramas, se analizaron las secuencias en ambas direcciones (sentido y contrasentido) para cada muestra. Las secuencias contrasentido se obtuvieron en forma reversa y complementaria, esto se realizó para que en el alineamiento todas las secuencias se encuentren en el orden 5' – 3'.

Sobre la base de los alineamientos obtenidos para cada gen, se confirmó la presencia de los sitios heterocigotos para cada muestra (revisión de ambas cadenas). En el caso de encontrar incongruencias, se revisó nuevamente los cromatogramas para verificar la información.

Finalmente, a partir de ambas secuencias (sentido y contrasentido) para cada muestra, se obtuvieron las secuencias consenso, que fueron las secuencias en base a las que se realizó los análisis posteriores (Figura 8). Adicionalmente, se incorporaron las secuencias consensos correspondientes a las cepas de referencia para los seis linajes de *T. cruzi*, además de cinco cepas de TcI pertenecientes a un área endémica en la Provincia de Chaco, Argentina (Figura 8).

#### 4.9.2 VARIBIALIDAD DE LOS GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS

Para determinar la variabilidad de los aislados ecuatorianos se obtuvo la siguiente información: el número de polimorfismos encontrado para cada locus, perfiles alélicos

(PA) y secuencias diploides tipo, DST (“diploid sequence type”). Para la obtención de los perfiles alélicos (PA), se considera a una secuencia, de una cepa cualquiera, como un alelo. Esta secuencia es luego comparada con las otras secuencias. Si son iguales, entonces se la considera como el mismo alelo, en cambio, si las secuencias comparadas difieren, entonces se la considera un alelo diferente. El análisis de los DST, tiene el mismo principio para obtener los PA, sin embargo, en este caso se comparó el conjunto de PA para cada aislado, es decir, cada aislado tiene un patrón de perfiles alélicos y este patrón es comparado entre cada muestra. Adicionalmente, se calculó el poder discriminatorio (“discriminatory power”) de cada gen, el cual indica la capacidad de cada gen para diferenciar entre dos muestras no relacionadas (Hunter, 1990).

Finalmente, se revisaron los alineamientos, específicamente en los sitios heterocigotos, con la finalidad de comparar entre las secuencias de cada gen y de esta forma establecer si dentro de las muestras utilizadas están circulando los homocigotos correspondientes. Esta información permite tener una idea de si se están dando eventos de recombinación en las poblaciones analizadas.

#### 4.9.3 DENDROGRAMAS FILOGENÉTICOS

Los árboles filogenéticos se elaboraron bajo el criterio de los estados intermedios (“average states”). Según este criterio, cuando hay un cambio de un nucleótido, el valor asignado es diferente dependiendo del nucleótido, esto quiere decir que no se considera el mismo valor sin tomar en cuenta el nucleótido, además esto permite que se tomen en cuenta a los sitios ambiguos o heterocigotos. Para realizar este análisis, se utilizó el programa SeaView (Galtier *et al.*, 1996), donde se concatenó los alineamientos correspondientes a los genes. Para el análisis general se incluyó las secuencias de las cepas

de referencia, de los aislados TcI de Argentina y Ecuador. Adicionalmente, se realizaron análisis separados de todas las muestras TcI y de las muestras ecuatorianas separadas por provincias. Las secuencias concatenadas obtenidas fueron analizadas con el programa Splits Tree4 (Huson y Bryant, 2006) y se utilizó la distancia p-no corregida, con la opción “average states” (estados intermedios) y se empleó el método de distancias Neighbor Joining (NJ).

Para el análisis combinado se utilizó como grupo externo (outgroup) a *T. cruzi marinkellei* (TcBM3). Mientras que para los análisis parciales de los aislados de TcI se usó como grupo externo la cepa de referencia CL Brener (TcVI). El cálculo del bootstrap se hizo en base a 1000 réplicas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

Se caracterizaron 35 muestras: 19 de contenido intestinal provenientes de la provincia de Loja, una muestra de contenido intestinal, una de cultivo y 14 cultivos clonales de la provincia de Manabí (Tabla 6). Todas las muestras analizadas corresponden al linaje TcI (Figura 9, 10 y 11).

### 5.2 TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS DE AISLADOS DEL LINAJE *Trypanosoma cruzi* I

Para la identificación de los haplotipos de TcI se seleccionaron 96 muestras y se realizó la MLST con secuenciación de 10 genes. Los criterios utilizados para esta selección fueron los siguientes: 1) que las muestras no presenten bandas inespecíficas durante la caracterización por PCR, 2) el origen de hospedero, con el fin de incluir la mayor cantidad de diversidad en cuanto a especies de vectores y reservorios, 3) se incluyó todos los clones de los aislados de Manabí que se habían obtenidos hasta ese momento debido a que en un trabajo anterior (Ocaña, 2010), la multiclonalidad de las muestras de Manabí complicó los análisis. El detalle del origen geográfico y de hospedero de los aislados y el origen del ADN se resumen en la Tabla 7. Además, se indica un resumen de todo el proceso que se siguió para obtener los aislados seleccionados (Tabla 8).

De las 96 muestras enviadas para ser secuenciadas con 10 genes, se utilizaron únicamente 41 muestras para los análisis de la MSLT, con siete de los 10 genes (excepto

los genes *gpi*, *gtp* y *lap*), debido a que las muestras restantes no presentaron cromatogramas analizables.

### 5.2.1 DIFICULTAD EN LOS ANÁLISIS DE CROMATOGRAMAS

En este estudio se presentaron varios problemas con la interpretación de los cromatogramas obtenidos. Según la metodología planteada, los cromatogramas fueron analizados manualmente en forma individual (cada cadena). De esta forma se verificó los nucleótidos asignados por el programa de secuenciación y se asignó el código correspondiente en los sitios heterocigotos. Para que este esquema de análisis funcione se requiere que los cromatogramas cumplan ciertos parámetros: **a)** buena definición de los picos: es decir, que cada pico se separe claramente del siguiente, lo que permite asignar un solo nucleótido inequívocamente (Figura 12). En el caso de existir un solapamiento en los picos, se dificulta la detección de sitios heterocigotos (Figura 13), que en una situación ideal serían fácilmente diferenciables (Figura 14), **b)** amplitud de los picos, se refiere a que si un pico presenta una amplitud mayor a la esperada se dificulta el determinar con exactitud si se trata de la representación de un nucleótido o de varios, esto se refleja en el alineamiento ya que se podría añadir o eliminar nucleótidos (Figura 15), **c)** ruido de fondo o artefactos, en este caso el ruido corresponde a la presencia de bandas que corresponden a la lectura de los marcadores de los nucleótidos ausentes, es decir, si el cromatograma indica la presencia de una adenina (A), el ruido de fondo va a ser causado por los otros nucleótidos (citosina, timina, guanidina). En una situación ideal, el ruido de fondo es bajo (Figura 16) y no causa confusión en la asignación del nucleótido. Sin embargo, en el caso de haber demasiado ruido de fondo, se dificulta la asignación del nucleótido y esto puede

causar que se agreguen nucleótidos inexistentes a la secuencia (Figura 17), provocando espacios en el momento de la alineación (Figura 18).

### 5.2.2 VARIABILIDAD DE CADA GEN

Se determinó la variabilidad encontrada para cada uno de los genes y posteriormente se realizó el análisis combinado, con siete genes del MLST (*coar*, *gp*, *pdh*, *rl-gtp*, *sttp-frag2*, *tcsoda* y *tcsodb*) de las 41 muestras seleccionadas.

### 5.2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA DE DIEZ GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS

Se obtuvo los perfiles alélicos de los diez genes que conforman el esquema del MLST. Se analizaron alrededor de 70 muestras para los genes *gp*, *pdh*, *rl-gtp*, *sttp-frag2*, *tcsodb* y *tcsoda*, 56 muestras para el gen *coar*, menos de 15 muestras para los genes *gpi* y *gtp*. No fue posible analizar las muestras con el gen *lap* debido a que no se tuvo cromatogramas analizables (Tabla 9).

El análisis de cada uno de los genes mostró una mayor cantidad de polimorfismo (16 polimorfismos) para el gen *coar*, con la presencia de 29 perfiles alélicos (genotipos) (Tabla 9), seguido por los genes *rl-gtp*, *gp* y *pdh*, que, a pesar de tener un mayor número de muestras, presentaron menor cantidad de polimorfismos, 8, 5 y 5 respectivamente (Tabla 9). Para los genes *gpi* y *gtp* se determinó un número de polimorfismos bajo (tres cada uno). Sin embargo, para el gen *tcsoda*, no se encontró polimorfismo (monomórfico) a pesar de que se analizaron más de 80 muestras (Tabla 9). Esta información fue confirmada mediante el cálculo del poder discriminatorio, DP (“discrimatory power”), el cual refleja la

capacidad de discriminar entre dos aislados no relacionados. El valor de DP fluctúa entre 0 y 1, siendo 1 el valor que indica el mayor poder discriminatorio y 0 la ausencia de discriminación. El DP del gen *tcsoda* fue de cero, debido a que se trata de un gen monomórfico. Los genes *gpi*, *sttp-frag2* y *tcsodb* presentaron los DP más bajos (0,59, 0,57 y 0,53), mientras que los genes *coar pdh*, *rl-gtp* y *gp* presentaron valores de DP superiores (Tabla 9). Dado que este valor no puede ser comparado entre los genes, debido al número desigual de muestras para cada gen, se lo volvió a calcular para las 41 muestras, correspondientes a siete genes, que fueron utilizadas para los análisis filogenéticos, cuya información se detalla más adelante. En las Tablas de la 10 a la 17 se presenta un resumen de los genotipos, número de muestras (aislados) y posiciones de los sitios polimórficos de cada uno de los genotipos o perfiles alélicos correspondientes a los diferentes genes.

También se realizó una revisión de todos los alineamientos, con énfasis en los sitios heterocigotos. Se encontraron muestras homocigotas para la mayoría de las posiciones y genes que presentaban heterocogosis (Tabla 18).

#### 5.2.4 VARIBIALIDAD EN LOS GENES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Como se indicó anteriormente se emplearon únicamente 41 muestras para los análisis de filogenia. Se obtuvieron los perfiles alélicos correspondientes a siete genes, y se estableció que el gen *coar* es el que presenta la mayor cantidad de polimorfismos (15) y perfiles alélicos (PA=25) (Tabla 19), lo que indica que este gen es muy informativo para nuestras muestras. Otros genes que también son informativos, pero con un número menor de polimorfismos, son: *rl-gtp* (seis polimorfismos y 11 PA), *pdh* (cinco polimorfismos y 12 PA) y *tcsodb* (cuatro polimorfismos y seis PA) (Tabla 19). Por otro lado, el gen *tcsoda*

no presentó ningún polimorfismo (DP=0) y tuvo un solo perfil alélico, lo cual nos demuestra que este gen no es informativo para las cepas ecuatorianas hasta ahora analizadas (Tabla 19). Otros genes que no presentaron un buen poder discriminatorio fueron los genes *sttp-frag2* (DP=0.62) y *tcsodb* (DP=0.57). El resto de genes incluidos en este estudio (*coar*, *pdh*, *rl-gtp* y *gp*) presentaron valores de DP altos, lo que indica que estos genes tienen un alto poder discriminatorio (Tabla 19). Adicionalmente, con estos siete genes se diferenciaron 41 secuencias diploides tipos (DST), es decir, cada muestra mostró un patrón diferente. Esto se vio reflejado al calcular el poder discriminatorio de todos los genes, en donde se encontró que el poder discriminatorio es igual a uno (DP=1) (Tabla 19), esto significa que aunque algunos de los genes individualmente, no tienen un DP alto, al ser combinados pueden discriminar entre los aislados.

#### 5.2.5 DINÁMICA DE LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN DE *Trypanosoma cruzi* I

Para la elaboración de los dendrogramas filogenéticos se utilizó 41 muestras que correspondían a la provincia de Loja y Manabí con siete genes correspondientes al esquema de la MLST (Tabla 20).

En la Figura 19 se encuentran el dendrograma con todos los aislados analizados del Ecuador incluyendo cepas de referencia correspondientes a los seis linajes (TcI-TcVI), aislados de TcI de Argentina. Se puede observar que todas las muestras TcI, tanto ecuatorianas como argentinas, se agrupan junto a las cepas de referencia correspondientes de TcI (X10c11, OPS21) (Figura 19). Se observa también una separación de las muestras ecuatorianas con las muestras argentinas (Figura 19), con excepción de las muestras de

Loja (domicio y peridomicilio), que aparecen cercanas a las muestras argentinas. Esta tendencia se confirma al analizar únicamente las muestras TcI (Figura 20).

En el dendrograma correspondiente a los aislados TcI (Figura 20), se observa divergencia basada en el hábitat de captura. Un grupo incluye la mayor parte de muestras silvestres tanto de Loja como de Manabí, mientras que los aislados de domicilio y peridomicilio de Loja y los aislados de peridomicilio de Manabí forman dos grupos separados (Figura 20), con excepción del aislado GA895, el cual formó un grupo totalmente independiente con dos aislados silvestres de Loja.

El análisis de las muestras de Loja confirma la presencia de dos poblaciones, una formada por los aislados provenientes de domicilio y peridomicilio y una segunda población formada por las muestras silvestres. Es importante señalar que en ambas poblaciones se observa flujo genético, es decir, en el grupo de las muestras de domicilio/peridomicilio se puede observar la presencia de dos muestras aisladas de ambiente silvestre (SJ1083 y SJ713) (Figura 21), mientras que en el grupo formado por muestras silvestres se observa la presencia de dos muestras aisladas en el peridomicilio (SJ1141 y TBR1391) (Figura 21). Si bien este resultado demuestra que existe flujo genético entre ambos hábitats, al parecer, este no es lo suficientemente constante como para romper la divergencia entre las dos poblaciones.

De igual manera, en la provincia de Manabí, el análisis muestra la formación de dos poblaciones, una de las cuales está principalmente formada por cepas silvestres, mientras que el segundo grupo está formado por cepas del peridomicilio. En este caso, el flujo genético entre ambos grupos también se hace evidente y se puede observar una muestra de peridomicilio (NG545) dentro del grupo silvestre y varios aislados silvestres (TMI2062c11, TTO2149c15, TDZ2179c11 y TTO2138c13) dentro del grupo peridomiciliar (Figura 22).

## 6 DISCUSIÓN

La Enfermedad de Chagas es un problema de salud pública, ya que se estima que cerca de 10 millones de personas, a nivel mundial, están infectadas con *T. cruzi*. Este estimado corresponde en su mayoría a la población de los países donde la ECh es endémica (WHO, 2010). Durante los últimos años, se han realizado muchos avances en las medidas de control para evitar la transmisión de *T. cruzi*. Estos logros se han obtenido, principalmente, a través de los programas de control vectorial, como es el caso de los países del Cono Sur, o por el tamizaje de la sangre de donantes, lo que ha permitido que el número de nuevos casos de la ECh disminuya (Moncayo y Silveira, 2009).

En el Ecuador, se estima que 230 000 personas están infectadas y el riesgo de transmisión abarca la mayor parte del territorio, debido a las condiciones ecológicas. Durante los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de la ECh en lo que respecta a los vectores (Grijalva y Villacís, 2009; Villacís *et al.*, 2008; Suárez-Dávalos *et al.*, 2010), a los reservorios (Pinto *et al.*, 2006), a los aspectos epidemiológicos (Grijalva *et al.*, 2003; 2005a; 2005b,) y a la seroprevalencia (Black *et al.*, 2007), y al estudio de la genética de poblaciones del parásito (Ocaña, 2010; Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). En relación a este último aspecto, la información obtenida sobre la variabilidad genética del parásito y su relación con los ciclos de transmisión han sido importantes para delinear las posibles formas en las que se está produciendo la dinámica de la transmisión de *T. cruzi* a humanos, especialmente en la provincia de Loja. Sin embargo, la genética de poblaciones del parásito no ha sido estudiada en detalle en otras provincias endémicas. Este estudio busca, mediante el uso de marcadores moleculares (secuenciación de genes), encontrar asociaciones genéticas entre los parásitos aislados que nos permitan

delinear la dinámica de transmisión en dos provincias endémicas para la ECh (Manabí y Loja).

## 6.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

En el presente estudio se determinó que todas las muestras caracterizadas pertenecían al linaje TcI, tanto de los aislados de *T. cruzi* obtenidos de vectores como de mamíferos. Esto coincide con un reporte previo, en el que se determinó a TcI como el linaje predominante circulando en Ecuador (Ocaña, 2010; Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). Sin embargo, el conocimiento sobre las asociaciones ecológicas y epidemiológicas que se tiene de los otros linajes (TcII-TcVI) es aún limitado (Miles *et al.*, 2009) y no se podría descartar la presencia de estos linajes circulando en el Ecuador. Para poder confirmar la presencia de los otros linajes en el Ecuador, sería necesario realizar muestreos dirigidos para capturar a los reservorios que han sido relacionados a cada uno de los otros linajes (TcII-TcVI) y que en el presente estudio no se encuentran.

TcI ha sido relacionado con los tres ciclos de transmisión debido a que se ha logrado identificar a este linaje en aislados provenientes de pacientes, vectores domiciliados y silvestres, así como de reservorios (Sánchez-Guillén *et al.*, 2006; Falla *et al.*, 2008; Luna-Marín *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2009;). Tanto los resultados obtenidos en este estudio, como un estudio previo con muestras ecuatorianas (Ocaña, 2010), apoyan esta tendencia. Las muestras que fueron caracterizadas como TcI en este estudio provienen de vectores y mamíferos capturados en los tres ciclos de transmisión (hábitats domiciliar, peridomiciliar y silvestre). Por la amplia distribución de TcI, se podría esperar que este linaje esté circulando en los pacientes chagásicos, sin embargo, no podríamos confirmar

esta tendencia debido a que hasta el momento no se ha logrado obtener aislados humanos para su caracterización.

## **6.2 TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS DEL LINAJE**

### ***Trypanosoma cruzi* I**

#### **6.2.1 DIFICULTAD EN LOS ANÁLISIS DE LOS CROMATOGRAMAS**

No todas las muestras que fueron secuenciadas para este estudio pudieron ser incluidas en los análisis debido a varias dificultades que se presentaron al momento de realizar las lecturas de los cromatogramas.

Uno de los problemas observados fue la presencia del ruido de fondo en los cromatogramas que no permitieron determinar la secuencia de nucleótidos correcta (Figura 17). En el caso de las muestras cuyo ADN provino directamente del contenido intestinal de los vectores, este fenómeno se puede explicar por la baja cantidad de ADN del parásito presente en la muestra. En el caso del ADN obtenido de cultivos, en donde la cantidad de parásitos es mayor y la presencia de ruido de fondo no puede ser atribuido a la baja concentración de ADN, la causa podría ser por la presencia de contaminantes como ARN (Slatko, 1994; Applied Biosystems, 2009).

En el caso de los cromatogramas que presentaron picos superpuestos, el análisis de los mismos no fue posible debido a que se podía leer como si existieran dos secuencias (Figura 13). La posible causa de este problema puede ser que primer reconozca más de un sitio de unión o que haya problemas con ADN molde (Slatko, 1994; Applied Biosystems, 2009).

La presencia de picos anchos o abiertos en los cromatogramas (Figura 15) puede tener varios orígenes, entre ellos el exceso de ADN, la presencia de sales contaminantes, es decir sales que no fueron removidas del ADN durante la extracción o por problemas en el funcionamiento del equipo (Slatko, 1994; Applied Biosystems, 2009).

El efecto directo de los problemas en la lectura de los cromatogramas fue la eliminación de las muestras de las que no se logró obtener una secuencia, esto influye directamente en la diversidad de las muestras seleccionadas para el análisis. Se recomienda rehacer la secuenciación de estas muestras para poder incluirlas en futuros análisis.

## 6.2.2 VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LA TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS

### 6.2.2.1 DETERMINACIÓN DEL PODER DISCRIMINATORIO DE LOS GENES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Los datos obtenidos de la variabilidad de los genes utilizados no son comparables entre sí, debido a que no fue posible obtener el mismo número de secuencias analizables para cada gen. Sin embargo, es importante mencionar que los siete genes incluidos en el análisis presentan polimorfismos para las muestras ecuatorianas. Esta característica es importante debido que son estos sitios polimórficos los que proporcionan un alto nivel discriminatorio a la técnica del MLST (Tavanti *et al.*, 2003; Bougnoux *et al.*, 2004). En el caso del gen *tcsoda*, se encontró que es monomórfico para todas las muestras analizadas por lo que no proporcionó información sobre la variabilidad de las muestras analizadas. En base a esta información se podría excluir el análisis de este gen dentro del esquema de MLST para las cepas ecuatorianas.

Cuando se está probando un método de tipificación es importante tomar en cuenta tres aspectos: 1) la capacidad de tipificación del método, es decir, la proporción de muestras que pueden ser diferenciadas y asignadas a un grupo con el uso de un marcador específico; 2) reproductibilidad, se refiere a la proporción de las muestras analizadas que dan el mismo resultados cuando se las vuelve a evaluar después de un periodo de tiempo y 3) el poder discriminatorio, que es la capacidad que tiene un método para diferenciar dos cepas no relacionadas (Hunter, 1990). Estudios anteriores que han aplicado el análisis de MLST han demostrado que esta técnica es reproducible y es considerado un buen método de tipificación (Tavanti *et al.*, 2003; 2005; Bougnoux *et al.*, 2004; Mauricio *et al.*, 2006). No obstante, la capacidad de tipificación depende tanto de los marcadores seleccionados (genes) como de la cantidad de polimorfismos encontrados para un grupo de muestras. En este sentido, este estudio demostró que, para las muestras ecuatorianas, al menos cuatro de los siete genes utilizados en el análisis poseen un alto poder discriminatorio (*coar*, DP=0,92; *pdh*, DP=0,89; *rl-gtp*, DP=0,88 y *gp*, DP=0,80) debido a que tienen un buen valor DP en forma individual. Sin embargo, al unir el efecto de los siete genes se observa que el valor discriminatorio general es bueno (DP=1) (Tabla 17). Además, el hecho de que algunos de los genes utilizados presenten un DP bajo (*sttp-frag2*, DP=0.62 y *tcsodb*, DP=0,57), nos indica que estos genes no pueden ser utilizados individualmente para diferenciar entre aislados. Se debe considerar que estos valores podrían variar al incrementar el número de muestras, en este caso, estos valores fueron los obtenidos para un número de muestras pequeño (41 muestras).

### 6.2.2.2 EVIDENCIA DE RECOMBINACIÓN EN LOS AISLADOS ECUATORIANOS

Al revisar los alineamientos, en los sitios heterocigotos específicamente, se observó la presencia de los homocigotos correspondientes, lo que sugirió que en estas poblaciones se podrían dar eventos de recombinación. Esto concuerda con los resultados previos obtenidos por análisis de microsatélites para muestras de la provincia de Loja, que determinó que las poblaciones del domicilio-peridomicilio tendrían esta tendencia, mientras los aislados silvestres tendrían una reproducción clonal (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). En la provincia de Manabí, el análisis de microsatélites no pudo establecer con claridad esta tendencia debido a que se detectó multiclonalidad en los aislados (Ocaña, 2010). En este estudio, la revisión de los sitios heterocigotos se la hizo de forma visual para confirmar la presencia de los homocigotos correspondientes, por este motivo no se puede relacionar esta tendencia (posibles eventos de recombinación) a una población determinada dentro de la provincia de Loja como lo hizo el análisis de microsatélites (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). Además, estas observaciones nos sugieren esta tendencia, por tal razón, una vez que se haya logrado obtener el resto de secuencias se deberían hacer análisis de desequilibrio y ligado, para demostrar esta tendencia.

### 6.2.3 LA DINÁMICA DEL LINAJE *Trypanosoma cruzi* I EN EL ECUADOR

El análisis de diferentes marcadores moleculares para determinar la heterogeneidad en *T. cruzi* ha establecido la presencia de seis DTU (TcI-TcVI) que forman grupos genéticamente separados. En este estudio, los aislados ecuatorianos, que fueron caracterizados como pertenecientes al DTU TcI, se agruparon con los aislados TcI de

referencia (X10c11 y OPS21) y los aislados TcI de Argentina, confirmando de esta forma la validez del protocolo de caracterización utilizado. Además, se estableció que los aislados ecuatorianos no se agruparon con los aislados de Argentina, lo que indica que se trata de poblaciones diferentes. Este resultado confirma la tendencia de separación genética de las muestras ecuatorianas con otros aislados de Latinoamérica, que había sido previamente reportada en un estudio de microsatélites (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010).

Podemos observar que las muestras silvestres tanto de Manabí como de Loja forman un solo grupo, mientras que las muestras de peridomicilio de Manabí se encuentran separadas de las muestras de domicilio/peridomicilio de Loja. Este resultado sugiere que existe un flujo genético entre las poblaciones silvestres de ambas provincias, mientras que evidencia una separación genética entre las poblaciones de domicilio/peridomicilio de ambas provincias. Esta tendencia contrasta con los resultados previos obtenidos del análisis de la relación entre la distancia geográfica y genética de aislados de la provincia de Loja (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010), en el que se observó que la población silvestre formaba grupos aislados, probablemente debido a la topografía del área; mientras que no se encontró una relación en la población domiciliar/peridomiciliar, es decir que había un flujo genético constante a lo largo de la geografía analizada. Las implicaciones en la transmisión no son claras aún, sin embargo, hay que tomar en cuenta que dependiendo de la técnica utilizada el poder de resolución varía y que en este análisis el número de aislados es pequeño y al aumentar la cantidad de aislados analizados, el posible flujo genético entre las poblaciones silvestres podría evidenciarse mejor.

Como se ha mencionado antes, TcI es un linaje que presenta una amplia distribución en el continente americano y una alta variabilidad entre los aislados (Sánchez-Guillén *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2007, Llewellyn *et al.*, 2009). Estudios previos que han buscado detectar la variabilidad intrínseca en el linaje TcI han demostrado la presencia

de cuatro haplotipos relacionados a los ciclos de transmisión: Ia: domicilio, Ib: domicilio y peridomicilio, Ic: peridomicilio, Id: silvestre (Herrera *et al.*, 2006; 2009; Falla *et al.*, 2009). Al observar los resultados de este estudio, se comprueba que los ciclos de transmisión si representan un factor de divergencia en TcI, sin embargo no se observa una asociación de las muestras con los genotipos planteados en Colombia. Además, la clara separación encontrada de las muestras ecuatorianas con otras muestras de Latinoamérica nos indica que los ciclos de transmisión no son el único factor de divergencia y que la distancia geográfica también está jugando un rol importante.

#### 6.2.3.1 AGRUPACIÓN DEL LINAJE *Trypanosoma cruzi* I EN LA PROVINCIA DE LOJA

La presencia de flujo genético entre las poblaciones domicilio/peridomicilio y silvestre, demuestra que al domicilio/peridomicilio están llegando parásitos provenientes del ambiente silvestre. En términos de control, este hecho confirma la importancia del monitoreo de las invasiones de poblaciones de triatominos (*R. ecuadoriensis*) desde las zonas silvestres, como se sugiere en el estudio de Grijalva y Villacís, 2009. Una situación similar se observa en la población de domicilio/peridomicilio en donde se encuentran dos muestras colectadas en el ambiente silvestre, lo que confirma que el flujo de poblaciones se da en ambos sentidos. Estos datos confirman la existencia de flujo entre ambientes, encontrado en un análisis previo de muestras de la provincia de Loja (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). La relación entre el movimiento de los hospederos (vectores y reservorios) y el flujo genético entre las poblaciones del parásito no es clara aún, pero un estudio previo en esta provincia, sugiere que los mamíferos sinantrópicos podrían tener una implicación directa en el flujo de poblaciones entre estos ambientes (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010). Lo

cual también se observa en nuestros resultados, ya que un aislado de los reservorios capturados en este estudio, se agrupó con la población silvestre, lo que demuestra que los reservorios están llevando los parásitos entre los dos ambientes como resultado de su ingreso a las viviendas en busca de alimento, debido a que sus ambientes naturales han sido disturbados por las actividades humanas. Además, en lo que respecta a los triatomíneos, los adultos serían los que están participando en el flujo genético entre las dos poblaciones del parásito, esto nos sugiere que no encuentras barreras que eviten su ingreso a las casas o su salida hacia el hábitat silvestre.

#### 6.2.3.2 AGRUPACIÓN DEL LINAJE *Trypanosoma cruzi* I EN LA PROVINCIA DE MANABÍ

En la provincia de Manabí, se mantiene la tendencia observada en Loja, en donde se definen dos poblaciones: una principalmente conformada por aislados del hábitat silvestre y otra, con aislados del peridomicilio. Esto constituye un resultado importante debido a que en un estudio previo (Ocaña, 2010) no se pudo evidenciar una tendencia de separación clara debido a la alta multiclonalidad detectada en las muestras de Manabí. En este estudio se incluyeron varios clones dentro del análisis.

Al igual de lo que sucede en la provincia de Loja, en Manabí, se observa que también existe un flujo entre el ambiente silvestre y el peridomicilio. Como se puede observar, el flujo en ambos casos está causado por *R. ecuadoriensis*, debido a que aislados colectados en ambientes silvestres se encuentran dentro del grupo del peridomicilio; y uno que fue colectado en el peridomicilio pertenece al grupo silvestre. Aunque no se puede afirmar que esta especie es la única responsable del flujo de poblaciones, es evidente que es una especie que está jugando un rol importante. La importancia de *R. ecuadoriensis* en

la conexión de los ambientes silvestres y peridomiciliar ha sido señalada en estudios de evaluación de las estrategias de control utilizadas en esta provincia (Grijalva *et al.*, 2011), en el que se demuestra la limitada efectividad de la estrategia aplicada debido a la alta re-infestación de los ambientes domiciliarios causada por triatominos que provienen del ambiente silvestre circundante. Sin embargo, no se descarta la importancia que puede tener la presencia y flujo de mamíferos sinantrópicos en esta región.

En las dos provincias se evidenció el flujo genético entre los ambientes: domicilio/peridomicilio y silvestre, en la provincia de Loja; peridomicilio y silvestre en la provincia de Manabí, lo que nos indica que mientras exista este flujo, la transmisión de la enfermedad de Chagas es activa, por tal motivo es importante que se desarrollen medidas de control de acuerdo a las condiciones de cada área, como son el monitoreo de las viviendas rociadas donde se da la re-infestación de triatominos, los proyectos educativos, para que se conozca la importancia de mantener limpio el interior y los alrededores de la casa, el mejoramiento y mantenimiento de las viviendas, para evitar que los triatominos ingresen y se instalen en el interior.

## 7 CONCLUSIONES

La Enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en Lationamérica y si bien en los últimos años se han hecho avances en el conocimiento de los diferentes factores que involucra esta enfermedad, la transmisión aún no ha logrado ser interrumpida en muchos países. En el Ecuador, se ha incrementado el conocimiento sobre los factores biológicos (genética del parásito, biología de los triatominos y reservorios) y su rol en la dinámica de la transmisión de la enfermedad.

Para realizar análisis moleculares con muestras biológicas, es importante trabajar con cultivos monoclonales, y más aún si se trata de *T. cruzi*, ya que este parásito se caracteriza por presentar una estructura multiclonal en la naturaleza, y cuando aislamos muestras de vectores y reservorios, se puede llegar a obtener más de una población del parásito, lo que dificulta los análisis.

Los resultados de este estudio demuestran la dinámica de las poblaciones de TcI, el principal linaje que circula en el país, en dos de las provincias endémicas para la ECh en Ecuador. En ambos casos se demuestra una clara separación entre los ciclos silvestre y domiciliar/peridomiciliar, sin embargo, y a pesar de esta tendencia en ambas provincias, es importante que al plantear una estrategia de control se consideren las diferencias ecológicas y epidemiológicas de cada región. En la provincia de Loja, las actividades de rociamiento y vigilancia epidemiológica tienen un efecto positivo y se puede plantear la eliminación de la transmisión, siempre y cuando la estrategia incluya la vigilancia vectorial de la re-infestación por poblaciones silvestres de triatominos (Grijalva, datos no publicados). Sin embargo, en Manabí, la aplicación de la misma estrategia demostró resultados limitados y se requiere el planteamiento de nuevas estrategias de control que se adapten a las características de la región.

## 8 LITERATURA CITADA

- Aguilar, V.H.M., Abad-Franch, F., Racines, J.V., Paucar, C.A. 1999. Epidemiology Chagas disease in Ecuador. A Brief Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 387-393.
- Applied Biosystems. 2009. DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Applied Biosystems Chemistry Guide*. Second edition. Foster City. U.S.A.
- Black, C.L., Ocaña, S., Riner, D., Costales, J.A., Lascano, M.S., Dávila, S., Arcos-Terán, L., Seed, J.R., Grijalva, M.J. 2007. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *The Journal of Parasitology* 93 (1): 12-16.
- Barnabé, C., Tibayrenc, M., Brisola C.M. 2005. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* natural clones from the state of Paraíba, Brazil. Short Communication. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (3): 273-275.
- Bougnoux, M.E., Morand, S., D'Enfert, C. Usefulness of Multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (4): 1290-1297.
- Bougnoux, M.E., Aanensen, D.M., Morand, S., Théraud, M., Spratt, B.G., D'Enfert, C. 2004. Multilocus sequences typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 243-252.
- Briceño-León, R. 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos de Saúde Pública* 25 (1): S71-S82.
- Brisse, S., Barnabé, A., Tibayrenc, M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30: 35-44.
- Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology* 31: 1218-1226.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M., Wiedbrauk, D.L. 1992. *Virology. A laboratory manual*. Academic Press Inc. San Diego. U.S.A. PP.250.
- Calderón, O.A. 2001. *Trypanosoma cruzi*: un parásito del cual queda mucho por conocer. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica* 8 (2): 1-5.
- Cordeiro, A.T., Michels, P.A.M., Delboni, L.F., Thiemann, O.H. 2004. The crystal structure of glucose-6-phosphate isomerase from *Leishmania mexicana* reveals novel active site features. *European Journal of Biochemistry* 271: 2765-2772.

Coura, J.R., De Castro, S.L. 2002. A Critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (1): 3-24.

Coura, J.R. 2007. Chagas disease: what is know and what is needed - A background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 113-122.

Cuba Cuba, C. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31 (2): 207-220.

Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N., Fernandes, O. 2002. Genetic diversity of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the Ribosomal DNA. Short communication. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (6): 877-880.

Devera, R., Fernandes, O., Coura J.R. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (1): 1-12.

Dias, J.C.P., Schofield, C.J. 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 103-121.

Diosque, P., Barnabé, C., Padilla, A.M., Marco, J.D., Cardozo, R.M., Cimino, R.O., Nasser, J.R., Tibayrenc, M., Basombrío, M.A. 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic área for Chagas´ disease in Argentina. *International Journal for Parasitology* 33: 997-1003.

Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G.A., Guhl, F. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica* 110: 15-21.

Folgueira, C., Requena, J.M. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 359-377.

Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. 1996. SEAVIEW and Phylo\_Win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS* 12 (6): 543-8.

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez I., Prat, J., Herrera, R.N., Lafuente, C.A., Luciardi, H.L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., Sergio-Salles, X. 2007. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista Española de Cardiología* 60 (3): 285-93.

Gaunt, M., Miles, M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (4): 557-565.

Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, I.A., Stothard, R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., Solis-Mena, S., Veazey, P., Miles, G.A.J., Acostak, N., Rojas de Ariask, A., Miles, M.A. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936-939.

- Grijalva, M.J., Escalante, L., Paredes, R.A., Costales, J.A., Rowland, E.C., Aguilar, H.M., Racines, J. 2003. Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the amazon region of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (4): 380-385.
- Grijalva, M.J., Chiriboga, R.F., Vanhassel, H., Arcos-Terán, L. 2005a. Improving the safety of the blood supply in Ecuador through external performance evaluation of serological screening of blood donors. *Journal of Clinical Virology* 34 (2): S47-S52.
- Grijalva, M.J., Palomeque-Rodríguez, F.S., Costales, J.A., Dávila, S., Arcos-Terán, L. 2005b. High Household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 42 (1): 68-74.
- Grijalva, M.J. Villacís, A.G. 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic habitats in the southern highlands (Loja province) of Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 708-711.
- Grijalva, M.J., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C.A., Baus, E.G. 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites & Vector* 4: 20.
- Guzmán-Marín, E.S., Zavala-Castro, J.E., Acosta-Viana, K.Y., Rosado-Barrera, M.E. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica* 10: 177-184.
- Herrera, C., Bargues, M.D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G.A., Guhl, F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. Short Communication. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 535-539.
- Herrera, C., Guhl, F., Falla, A., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G.A., Bargues, M.D. 2009. Genetic variability and phylogenetic relationships within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on miniexon gene sequences. *Journal of Parasitology Research*. ID: 897364.
- Hughes, A.L., Piontkivska, H. 2003. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: Evidence for parphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Molecular Biology and Evolution* 20 (4): 644-652.
- Huson, D.H., Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23 (2): 254-67.
- Hunter, P.R. 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (9): 1903-1905
- Kawashita, S.Y., Sanson, G.F.O., Fernandes, O., Zingales, B., Briones, M.R.S. 2001. Maximum-Likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Molecular Biology and Evolution* 18 (12): 2250-2259.

- Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S.A., Gaunt, M.W. 2009. Genome-scale multilocus microsatellitotyping of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveal phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog 5 (5): e1000410. doi:10.1371/journal.ppat.1000410
- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A. 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* : Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 86 (1): 1041-1049.
- López-Antuñano, F., Rangel-Flores, H., Ramos, C. 2000. Diagnosis of Chagas' Disease. Revista latinoamericana de Microbiología 42: 121-129.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliviera, R.P., Pena, S.D.J. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of population and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99 (1): 1-12.
- Maiden, C.J.M., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 95: 3140-3145.
- Manoel-Caetano, F.S., Silva, A.E. 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cadernos de saúde pública 23 (10): 2263-2274.
- Marin-Neto, J.A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A.C., Rassi, A. 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104 (1): 319-324.
- Mauricio, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, P., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A. Toward multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for the five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGC). International Journal for Parasitology 36 (7): 757-69.
- Mejía, A.J., Paláu, M.T., Zúñiga, C.A. 2004. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. Revisión de Tema. MedUnab 721: 166-171.
- Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G. 1977. The identification by isoenzymes patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71 (3): 217-25.
- Miles, M.A., Souza, A., Povoá, M., Shaw, J.J., Lainson, R., Toyé, P.J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature 272 (5656): 819-21.

Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., Rojas de Arias, A. 2003. American trypanosomiasis (Chagas's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Clinical review. *BMJ* 326 (7404): 1444-8.

Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., Mauricio, I.L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136 (12): 1509-1528.

Miles, M.A., 2009. American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En: Manson's Tropical Disease. Protozoan Infections (G.C. Cook y a.I. Zumla, eds) pp. 1327-1339. Saunders Elsevier limited

Molina-Garza, Z.J., Rosales-Encina, J.L., Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, D. 2007. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública* 49: 37-44.

Moncayo, A., Ortiz Yanine, M.I. 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100 (8): 663-677.

Moncayo, A., Silveira, C.A. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 17-30.

Nobrega, A.A., García, M.H., Tatto, E., Obara, M.T., Costa, E., Sobel, J., Araujo, W.N. 2009. Oral Transmission of Chagas Disease by consumption of Acaí Palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 15 (4): 653-655.

O'Connor, O., Bosseno, M.F., Barnabé, C., Douzery, J.P.E., Brenière, S.F. 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 7: 587-593.

Ocaña, S.B. 2005. Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* (Tripanosomatidae) de cuatro provincias del Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, M.S., Costales, J.A., Miles, M.A., Gijalva, M.J. 2010. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* I in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (12): e915.

Ocaña, S.B. 2010. Determinación de linajes y dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en dos provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en Ecuador. Tesis de doctorado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M.S., Grijalva, M.J. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *The Journal of parasitology* 96 (2): 1251-1255.

- Reyes, P.P.A., Vallejo, M. 2009. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). Cochrane Database of Systematic Reviews 4: 1-16.
- Roberts, L.S., Janovy, J. 2005. Foundations of Parasitology. McGraw Hill Higher Education, Seventh Edition. New York. USA.
- Sánchez, O., Mora, M.C., Basombrío, M.A. 2005. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. Pediatrics 115 (6): 668-72.
- Slatko, B. E. 1994. Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. En: Protocols for gene analysis. Chapter 4 (A.J. Harwood) pp.35-45. Humana Press Inc. New Jersey. U.S.A.
- Sousa, O.E., Samudio, F., De Junca, C., Calzada, J.E. 2006. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (4): 455-457.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology 83: 141-152.
- Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campella, D.A. 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology 33: 269-279.
- Stolf, B.S., Souto, R.P., Pedroso, A., Zingales, B. 2003. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. Molecular & Biochemical Parasitology 126: 73-80.
- Suárez-Dávalos, V., Dangles, O., Villacís, A.G., Grijalva, M.J. 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in central-coastal Ecuador. Journal of medical entomology 47 (1): 80-88.
- Tavanti, A., Gow, N.A.R., Senesi, S., Maiden, M.C.J., Odds, F.C. 2003. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology 41 (8): 3765-3776.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Johnson, E.M., Maiden, M.C.J., Shaw, D.J., Gow, N.A.R., Odds, F.C. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. Journal of Clinical Microbiology 43 (11): 5593-5600.
- Urwin, R., Maiden, M.C.J., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for a global epidemiology. Trends in Microbiology 11 (10): 479-487.
- Villacís, A.G., Arcos-Terán, L., Grijalva, M.J. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 103 (7): 690-695.
- World Health Organization. 2002. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series. Geneva 109pp.

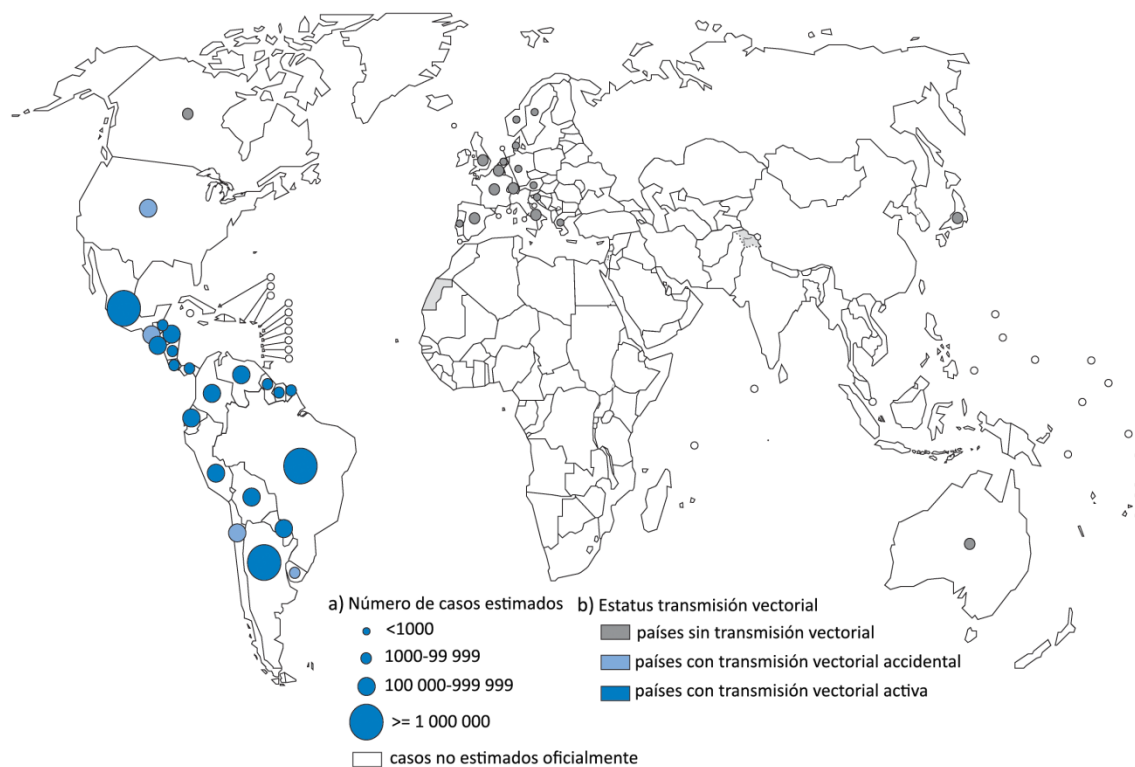
World Health Organization. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. Francia 172pp.

Yeo, M., Lewis, M.D., Carrasco, H.J., Acosta, N., Llewellyn, M., Da Silva Valente, S.A., De Costa Valente, V., Rojas de Arias, A., Miles, M.A. 2007. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *International Journal for Parasitology* 37: 111-120.

Zingales, B., Stolf, B.S., Souto, R.P., Fernandes, O., Briones, M.R.S. 1999. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 159-164.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (7): 1051-1054.

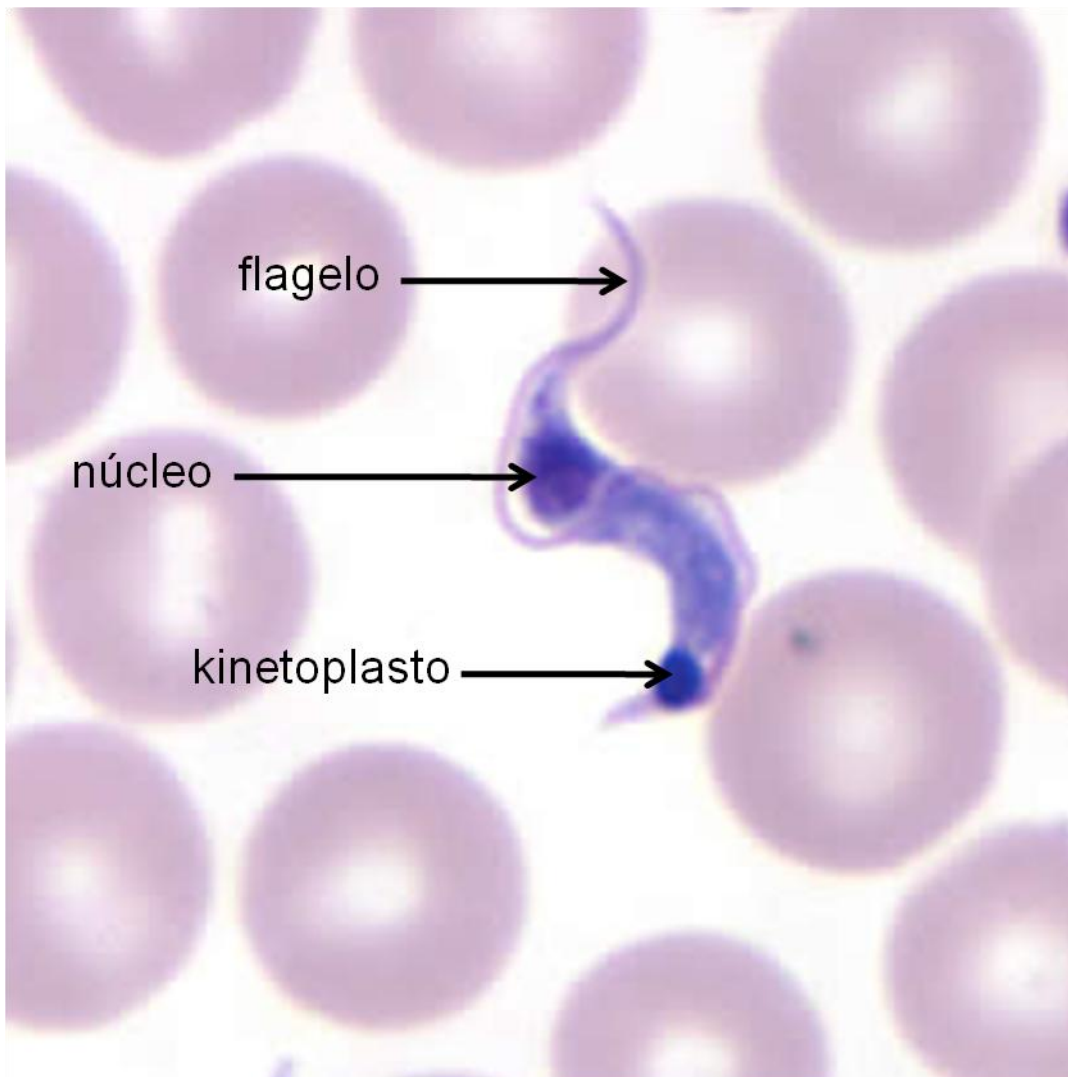
## **9 FIGURAS**



**Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo.**

a) El número de casos estimados de la ECh varía dependiendo de país debido a varios factores como la diversidad de triatomíneos y la influencia de los programas de control aplicados en las diferentes regiones. b) La transmisión vectorial activa se concentra en los países de América Latina, mientras que los reportes de casos en otras regiones se debe, principalmente, a la migración.

Modificado de [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_chagas\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png)

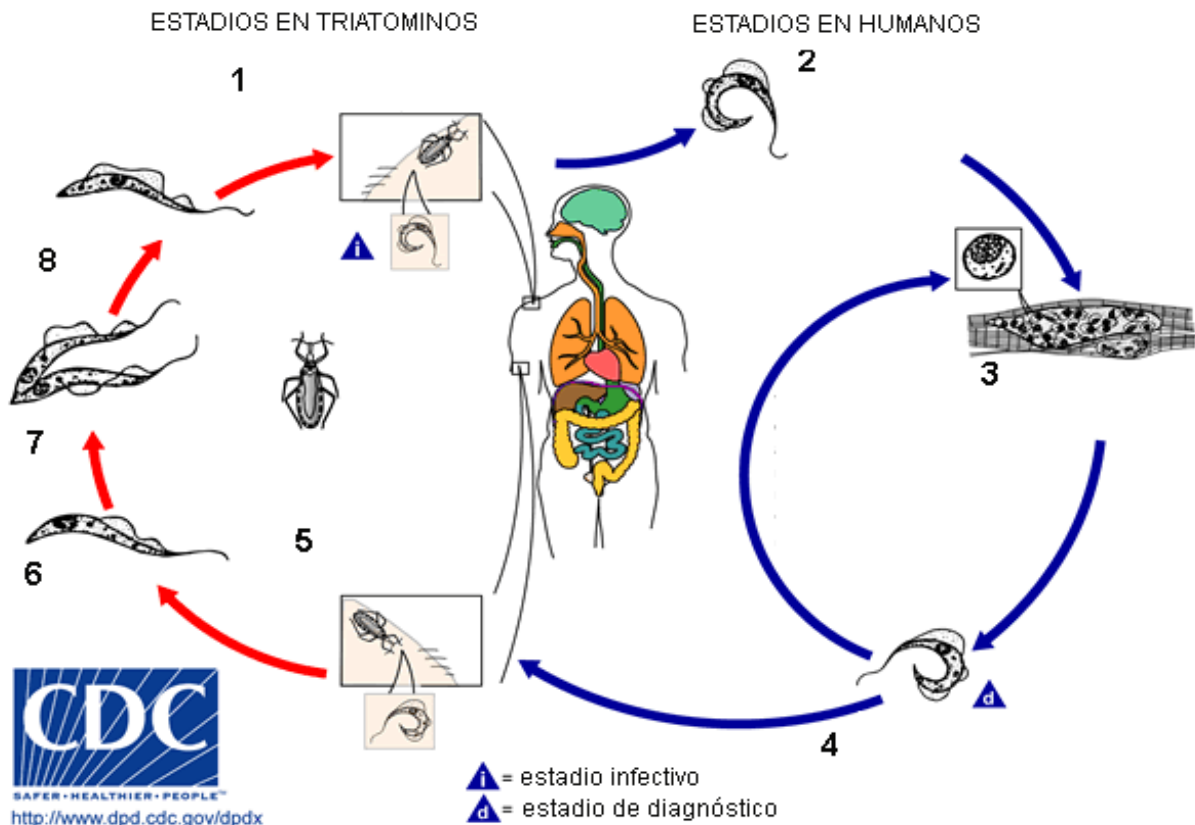


**Figura 2. Morfología de *Trypanosoma cruzi*.**

Un tripomastigote en la sangre, donde se observa el núcleo, flagelo y, en particular el kinetoplasto, que es parte de la mitocondria, y cuya presencia da el nombre al orden kinetoplastida a la cual pertenece *T. cruzi*.

Modificado

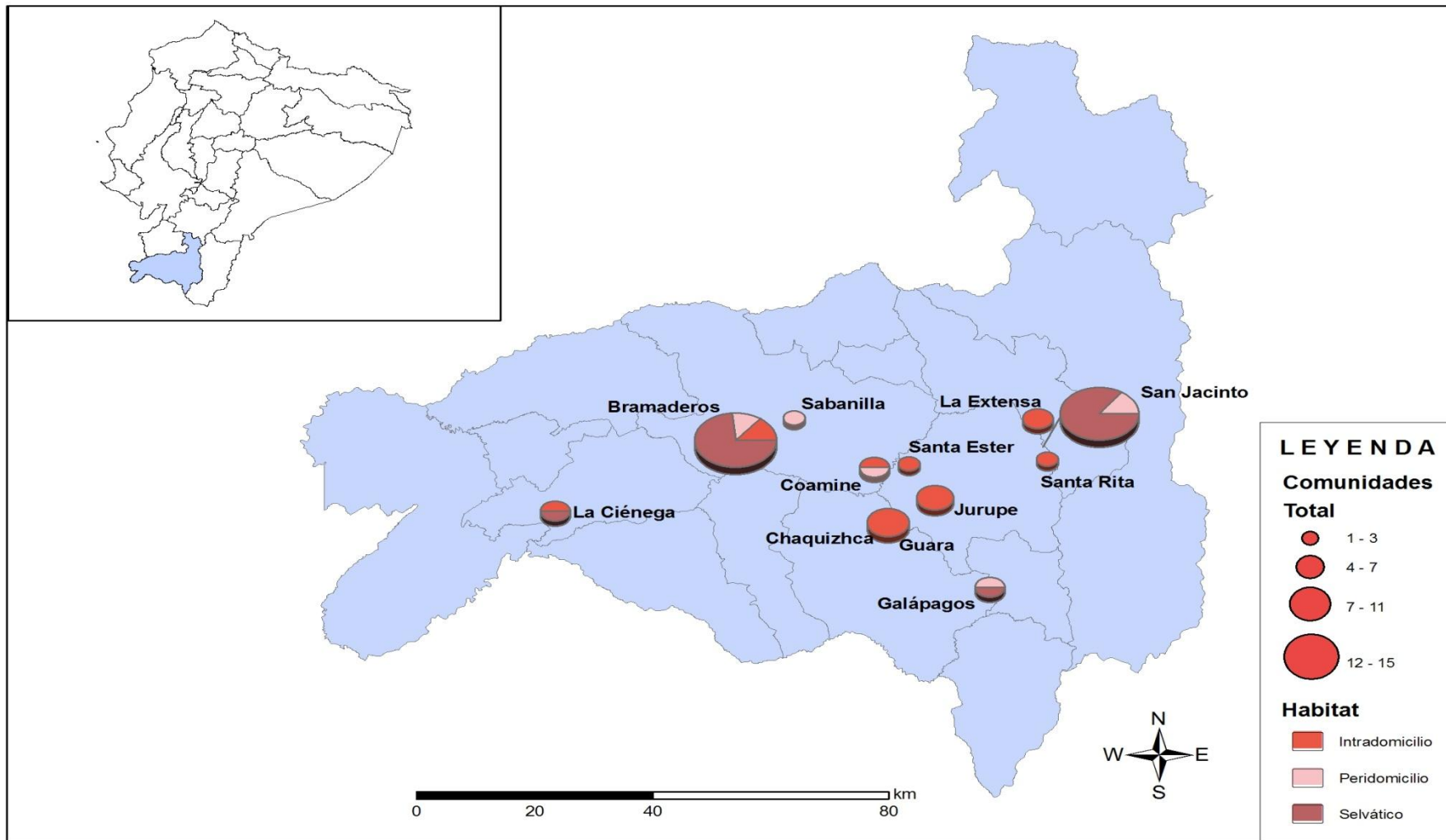
[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm)



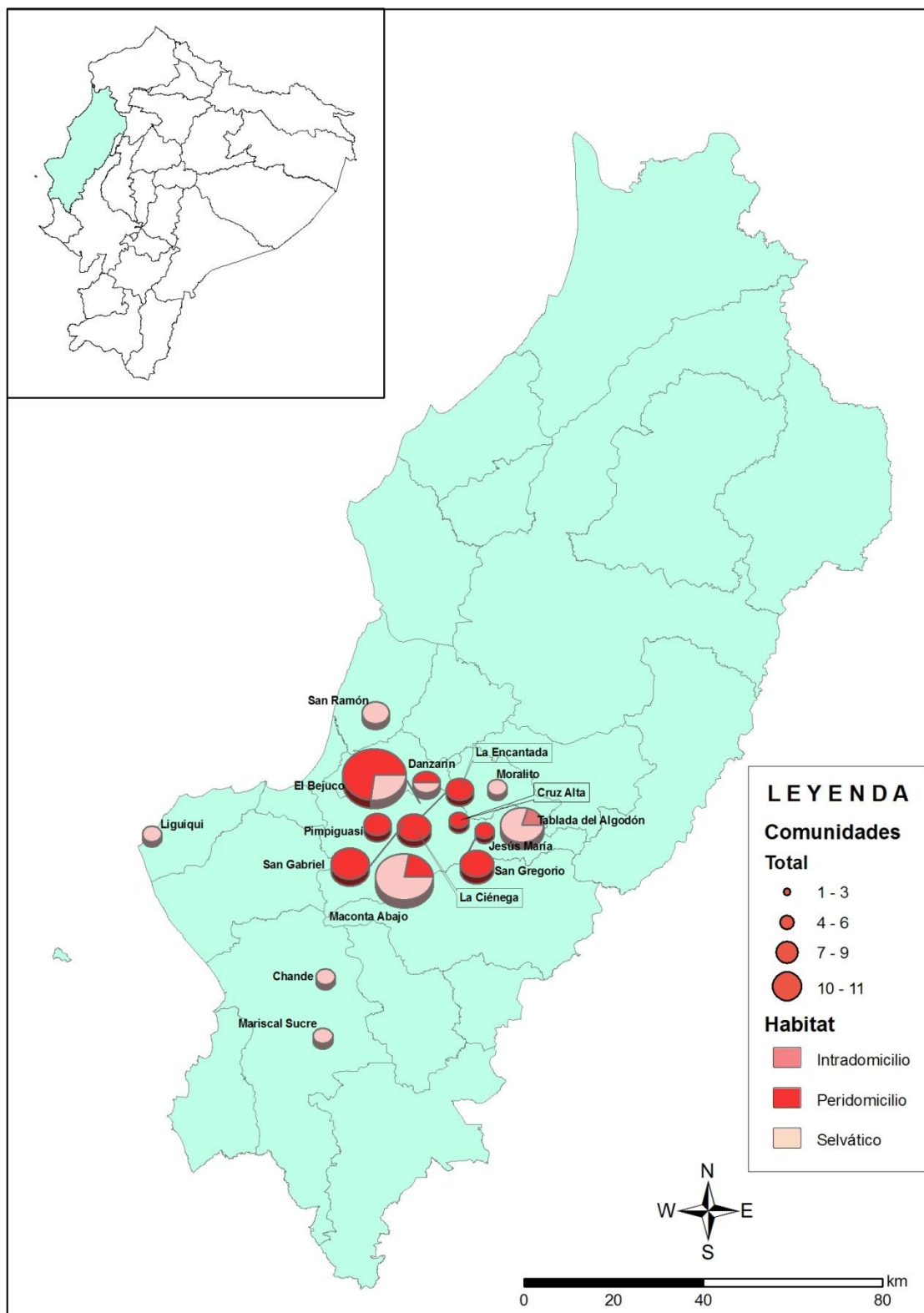
**Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.**

El ciclo de vida de *T. cruzi* se lleva a cabo en dos hospederos diferentes (el insecto vector y el mamífero reservorio): 1) cuando un triatominos infectado se alimenta de la sangre de un ser humano, deposita sus heces cerca del lugar de la picadura. Las heces contienen los tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva del parásito), permitiendo que el parásito ingrese por la picadura o las mucosas; 2) una vez que los tripomastigotes están en el torrente sanguíneo, ingresan a las células del cuerpo; 3) en el interior de las células, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, la forma reproductiva en el hospedero mamífero; 4) posteriormente se transforman los tripomastigotes y son liberados al torrente sanguíneo. Parte de estos parásitos liberados invaden otras células, mientras que otros circulan por el torrente sanguíneo; 5) cuando un triatominos se alimenta de la sangre de un ser humano infectado, adquiere los tripomastigotes sanguíneos; 6) en el intestino medio del vector, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes; 7) los epimastigotes, que son la forma reproductiva en el triatominos, se reproducen por fisión binaria; 8) cuando los epimastigotes llegan al intestino grueso, se transforman en tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva del parásito) y el vector se vuelve un potencial transmisor de la ECh.

<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.ht>

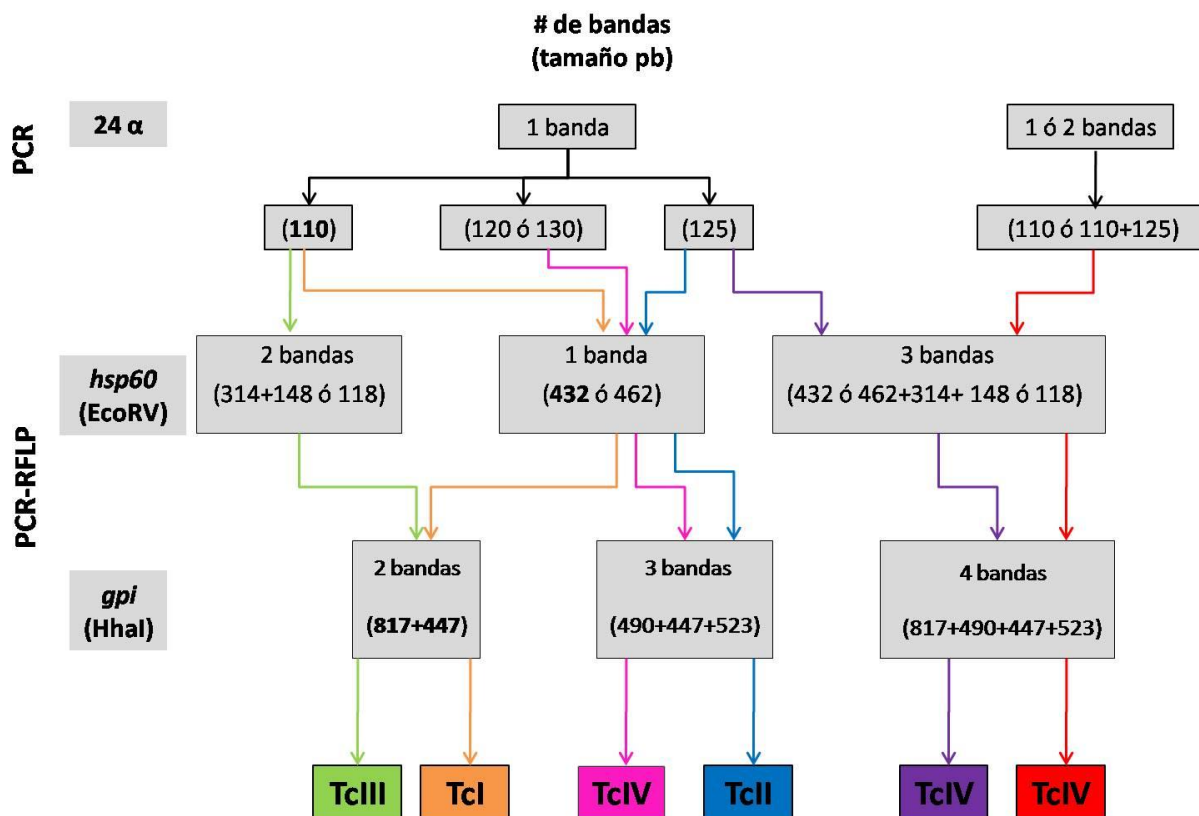


**Figura 4. Ubicación geográfica de las comunidades de donde se obtuvieron aislados de *Trypanosoma cruzi* en la provincia de Loja.** Se muestra la distribución de las muestras en relación al hábitat de captura (intradomicilio, peridomicilio y silvestre).



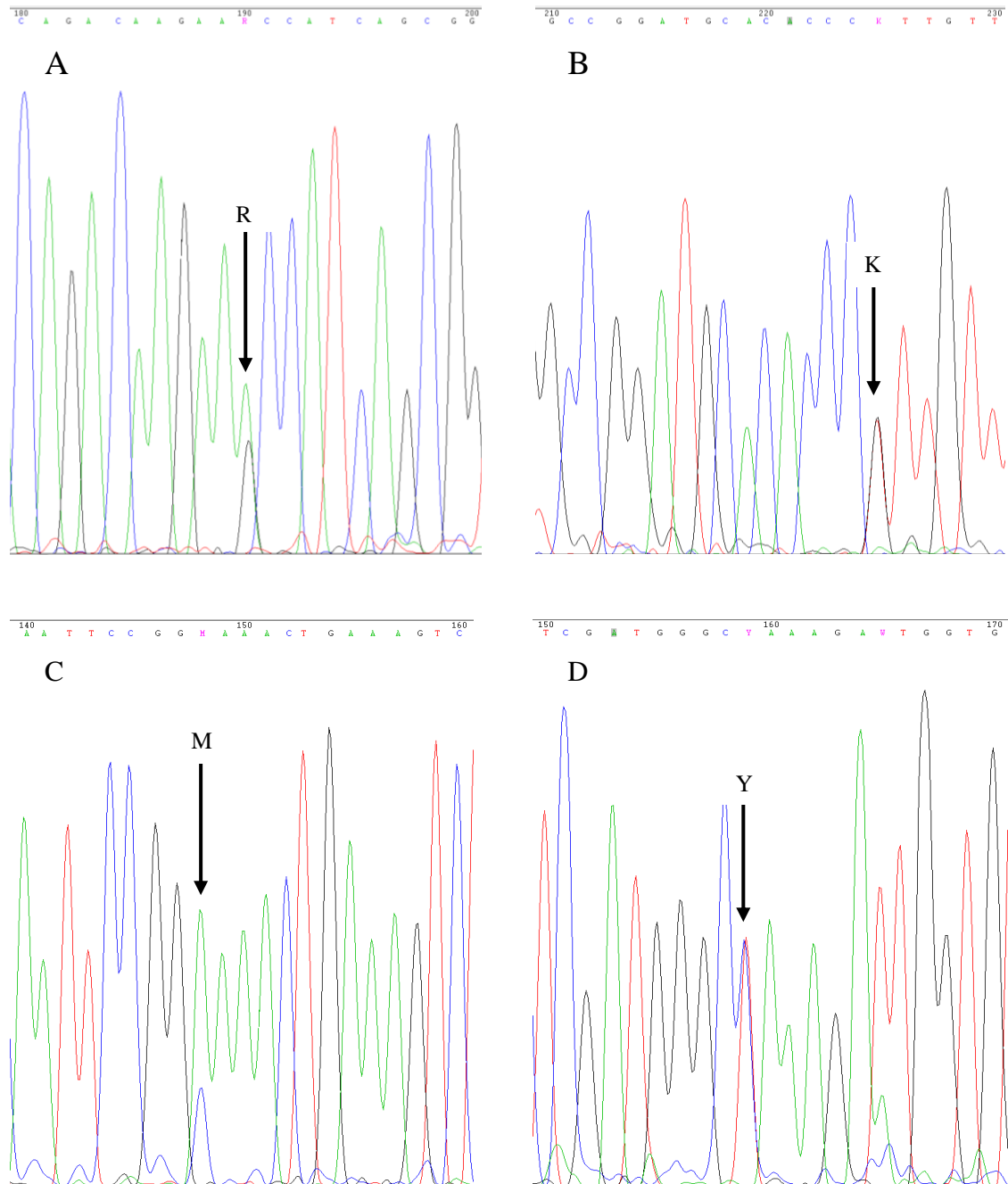
**Figura 5. Ubicación geográfica de las comunidades de donde se obtuvieron aislados de *Trypanosoma cruzi* en la provincia de Manabí.**

Se muestra la distribución de las muestras en relación al hábitat de captura: intradomicilio, peridomicilio y selvático.



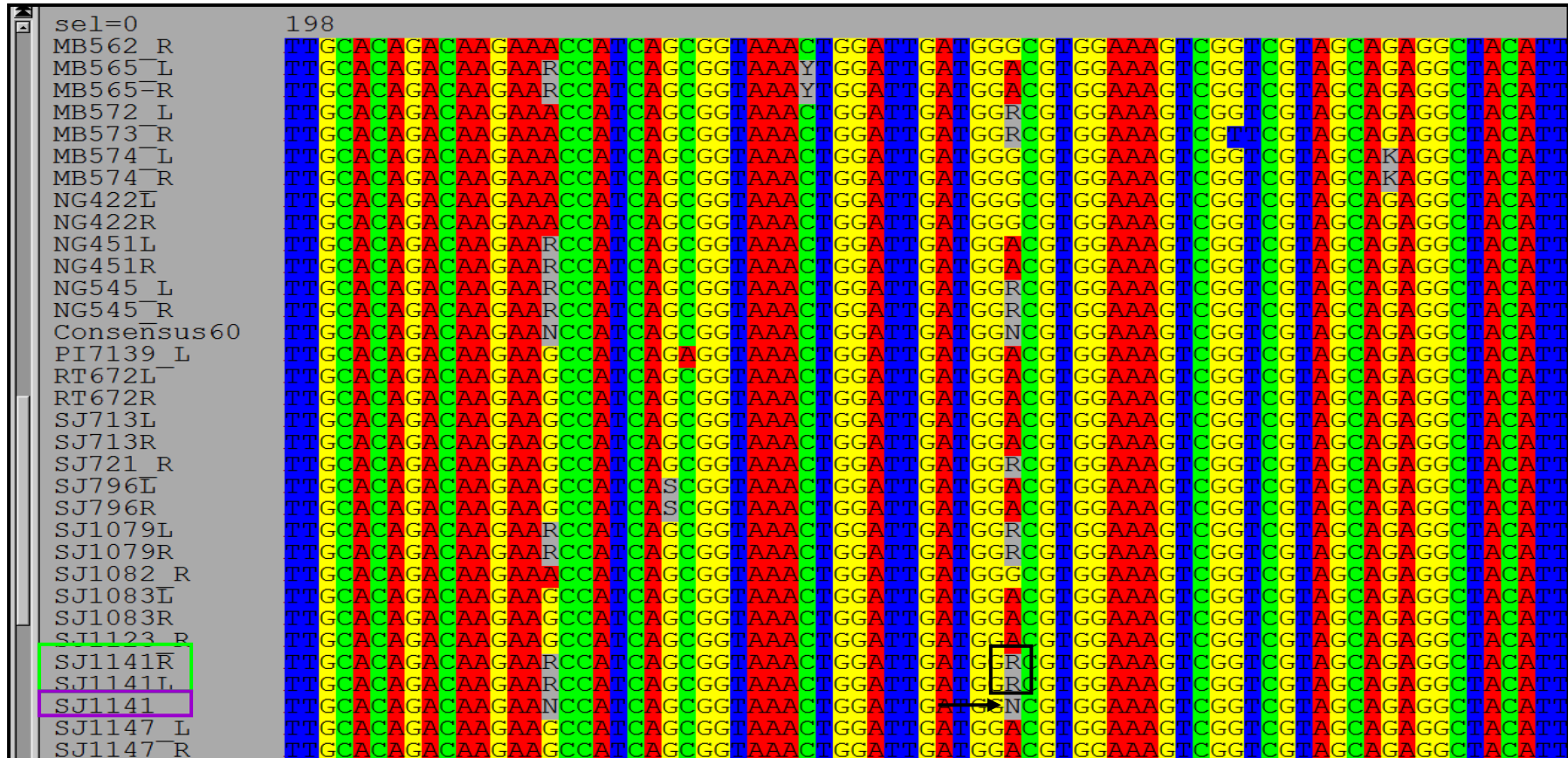
**Figura 6. Esquema para la caracterización de linajes de *Trypanosoma cruzi*.**

Se observan los pesos moleculares esperados para los productos de PCR para los genes 24SarARN, *hsp60* y *gpi* correspondientes a los seis linajes de *T. cruzi*. En negritas están los pesos moleculares esperados para la caracterización del linaje TcI (Ocaña, 2010).



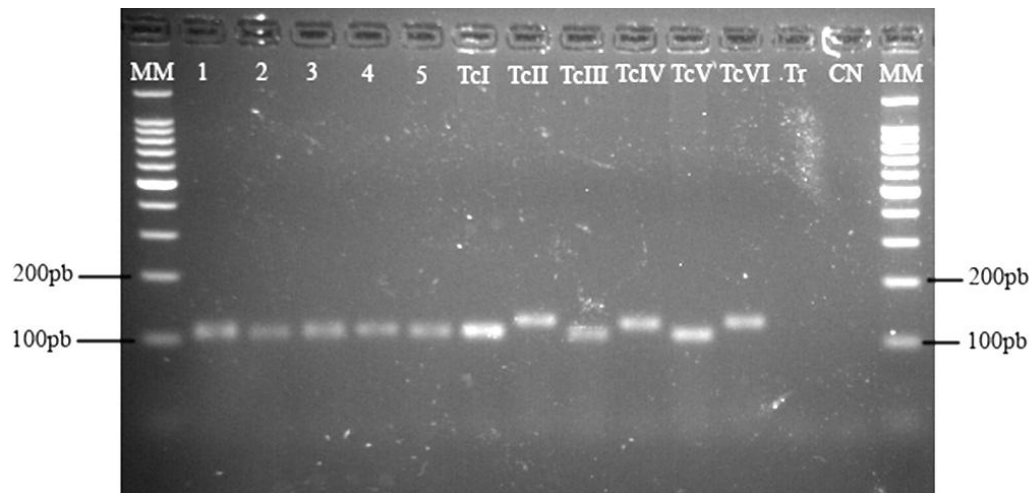
**Figura 7. Representación de sitios heterocigotos o ambiguos.**

Las flechas indican los sitios heterocigotos. (A) Formado por una adenina y guanina, representado por la letra R. (B) Compuesto por una timina y guanina, denominado por la letra K. (C) Conformado por una adenina y citosina, nombrado por la letra M. (D) Constituido por una timina y citosina, denominado por la letra Y.



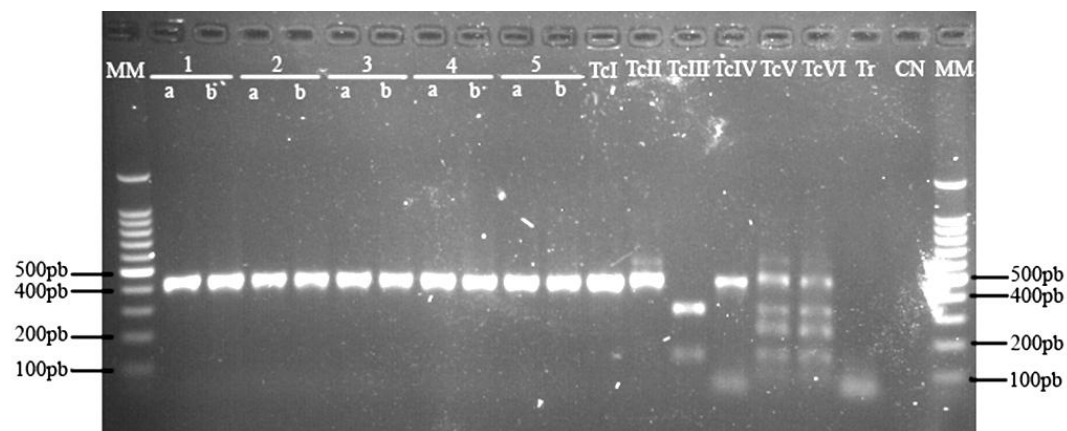
**Figura 8. Alineamiento de cepas ecuatorianas.**

Se observa el alineamiento de las secuencias de cada muestra en ambas direcciones (sentido y contrasentido) (rectángulo verde), así como las secuencias consensos con sus códigos definitivos (rectángulo rosado). Nótese que los sitios heterocigotos en la secuencia consenso, son representados con la letra N (flecha negra) y deben ser cambiados a la letra que les corresponda según el IUPAC (rectángulo negro).



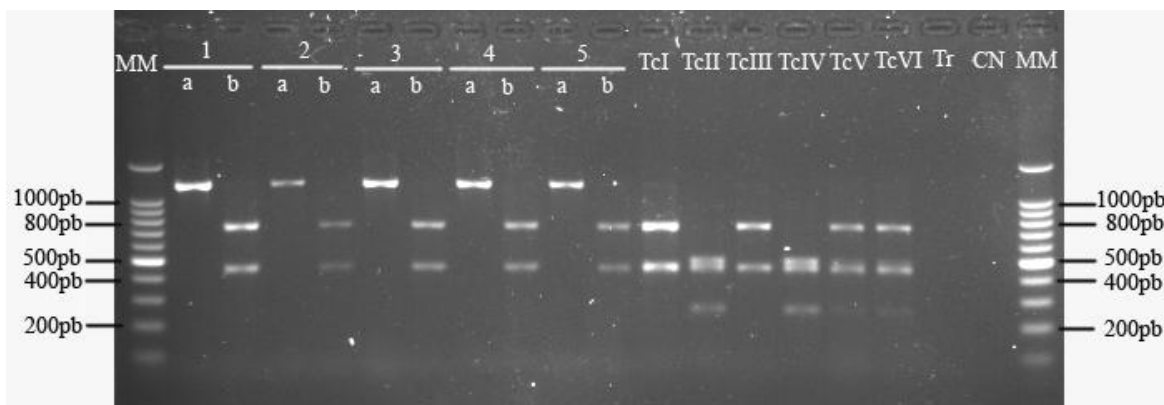
**Figura 9. Amplificación del gen *24Sα* rARN de cultivos clonales de *T. cruzi*.**

MM, marcadores de peso molecular; 1, TDZ2064cl4; 2, TMI2062cl1; 3, TTO2149cl5; 4, TRM2107cl2; 5, TTO2138cl3. Controles, TcI (X10/1); TcII (Esmcl3); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.



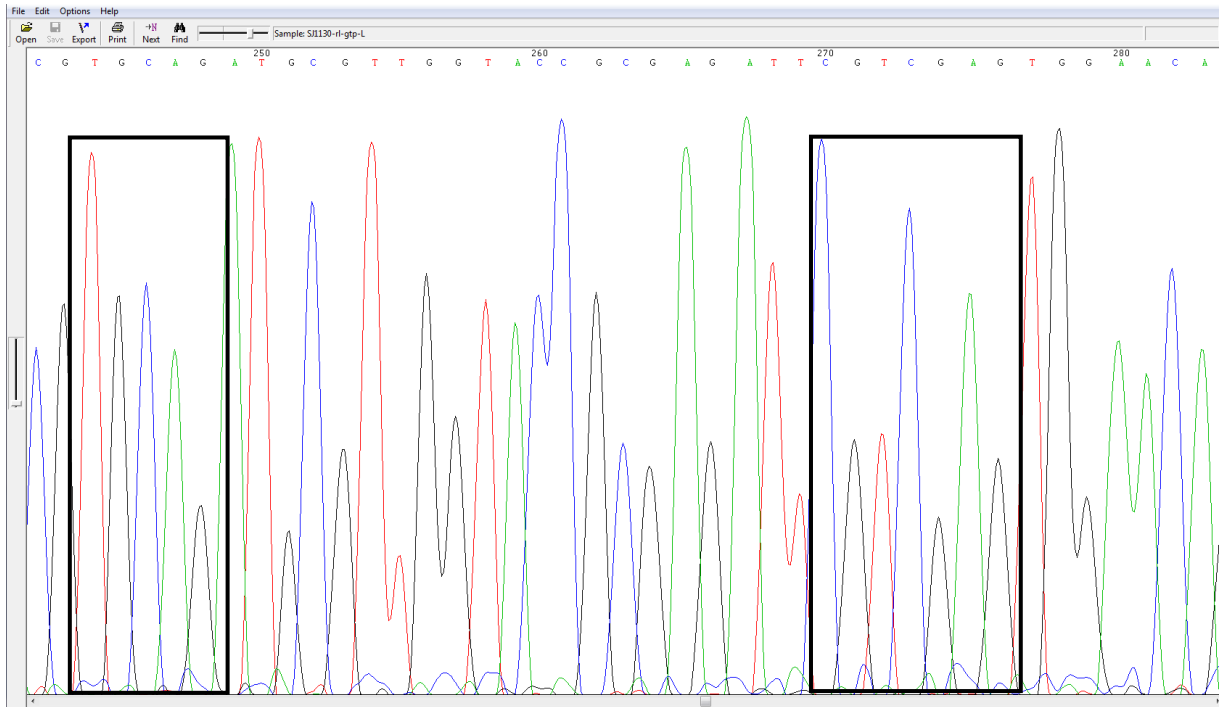
**Figura 10. Amplificación del gen *hsp60* de cultivos clonales de *T. cruzi*.**

MM, marcadores de peso molecular; a, producto de amplificación; b, producto de restricción; 1, TDZ2064cl4; 2, TMI2062cl1; 3, TTO2149cl5; 4, TRM2107cl2; 5, TTO2138cl3. Controles, TcI (X10/1); TcII (Esmcl3); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.



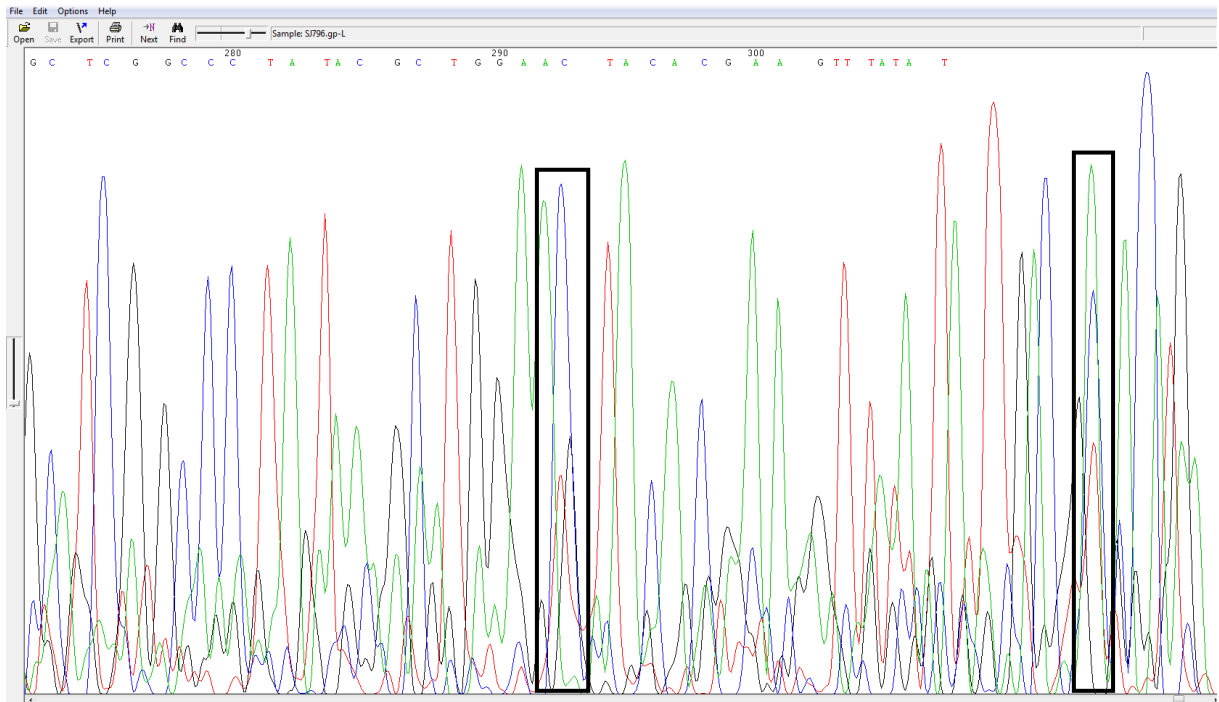
**Figura 11. Amplificación del gen *gpi* de cultivos clonales de *T. cruzi*.**

MM, marcadores de peso molecular; a, producto de amplificación; b, producto de restricción; 1, TDZ2064cl4; 2, TMI2062cl1; 3, TTO2149cl5; 4, TRM2107cl2; 5, TTO2138cl3. Controles, TcI (X10/1); TcII (Esmcl3); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.



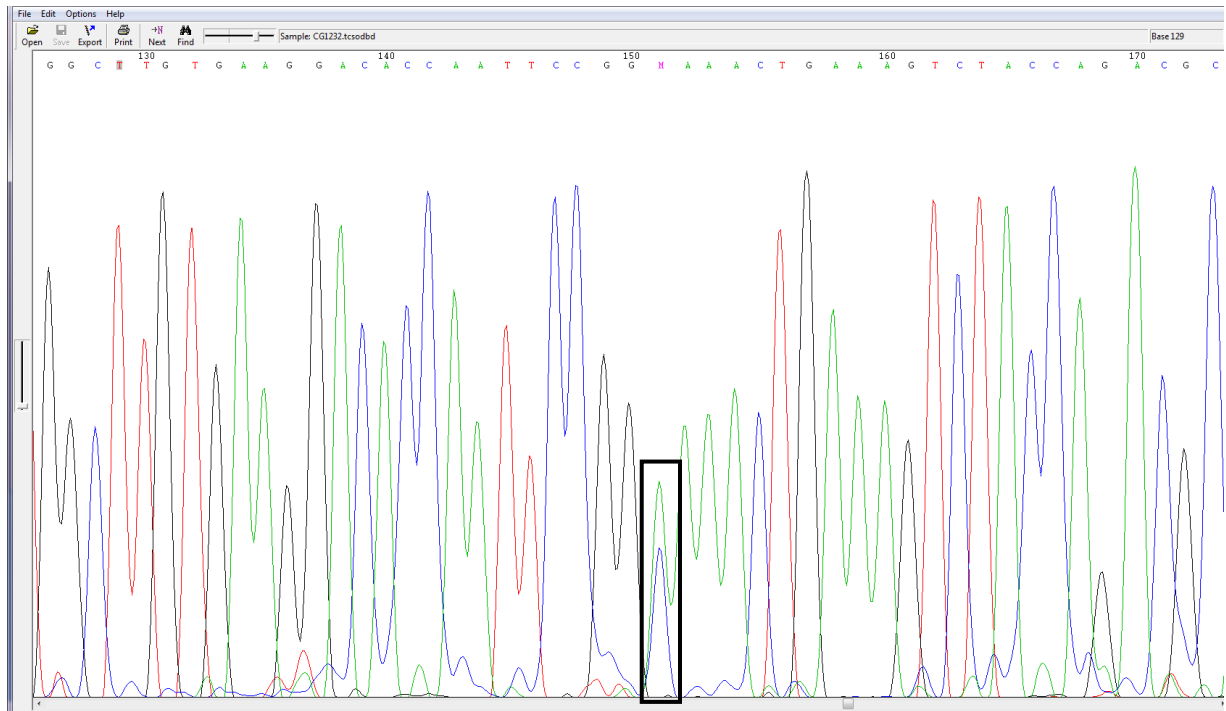
**Figura 12. Representación de picos de un cromatograma que cumple los parámetros para una correcta interpretación.**

En los rectángulos negros se observa que los picos son claros, y no hay confusión en el momento de revisarlos y asignar un nucleótido a cada pico.



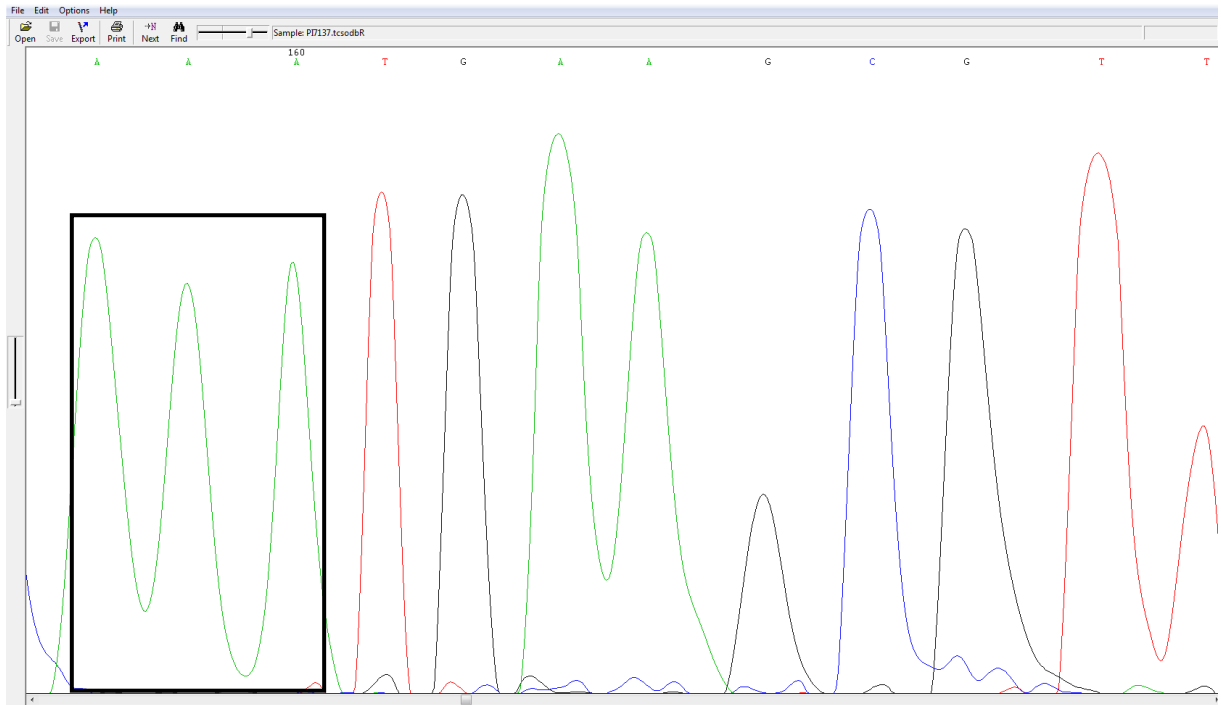
**Figura 13. Representación de picos sobrepuestos de un cromatograma.**

La sobreposición de picos (rectángulo negro) impide definir un solo nucleótido o identificar un sitio heterocigoto.



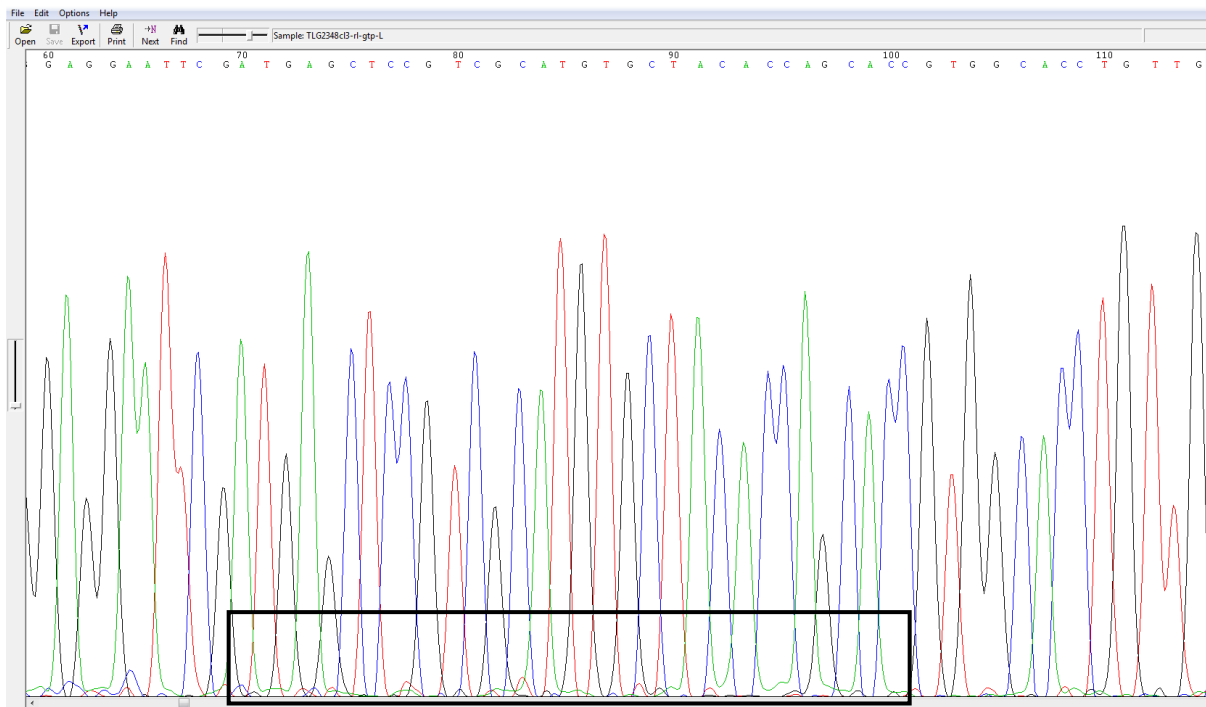
**Figura 14. Cromatograma con un sitio heterocigoto.**

La presencia de sitios heterocigotos se define por la presencia de dos picos superpuestos (rectángulo negro), pero claramente definibles.



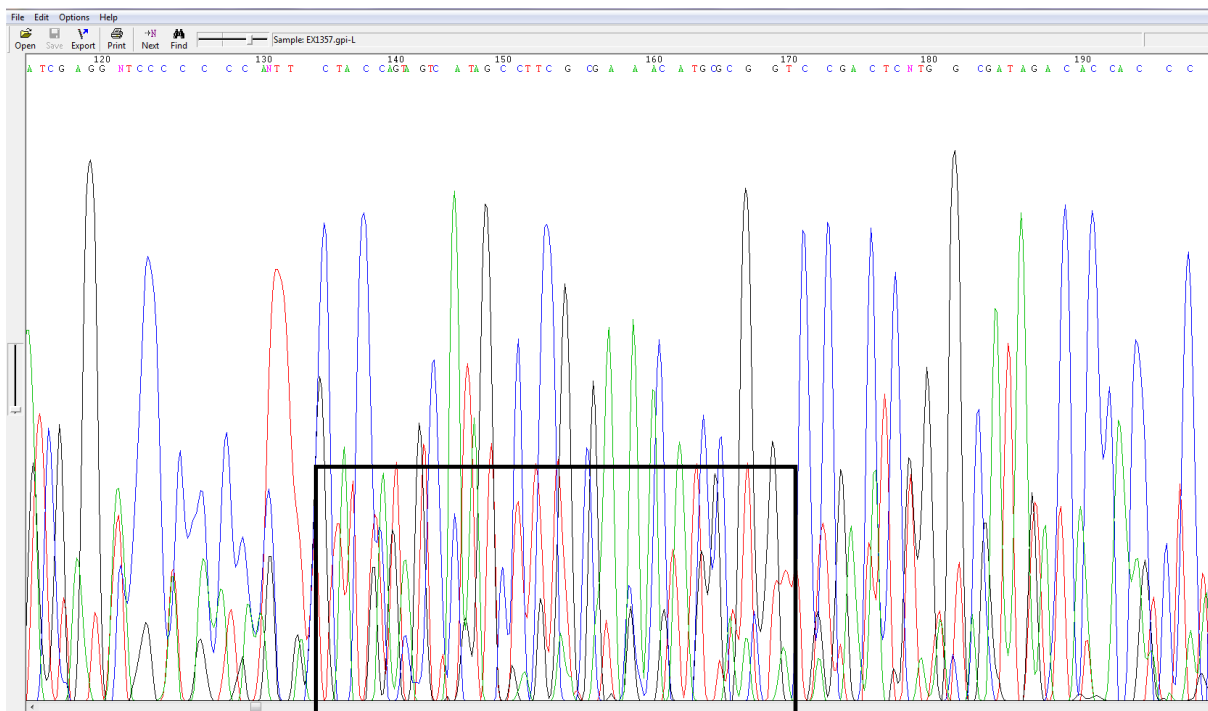
**Figura 15. Representación de picos anchos de un cromatograma.**

El exceso de amplitud de los picos (rectángulo negro) impide determinar con exactitud si representa un solo nucleótidos o más. El efecto de de estas lecturas se puede reflejar en el exceso o falta de nucleótidos.



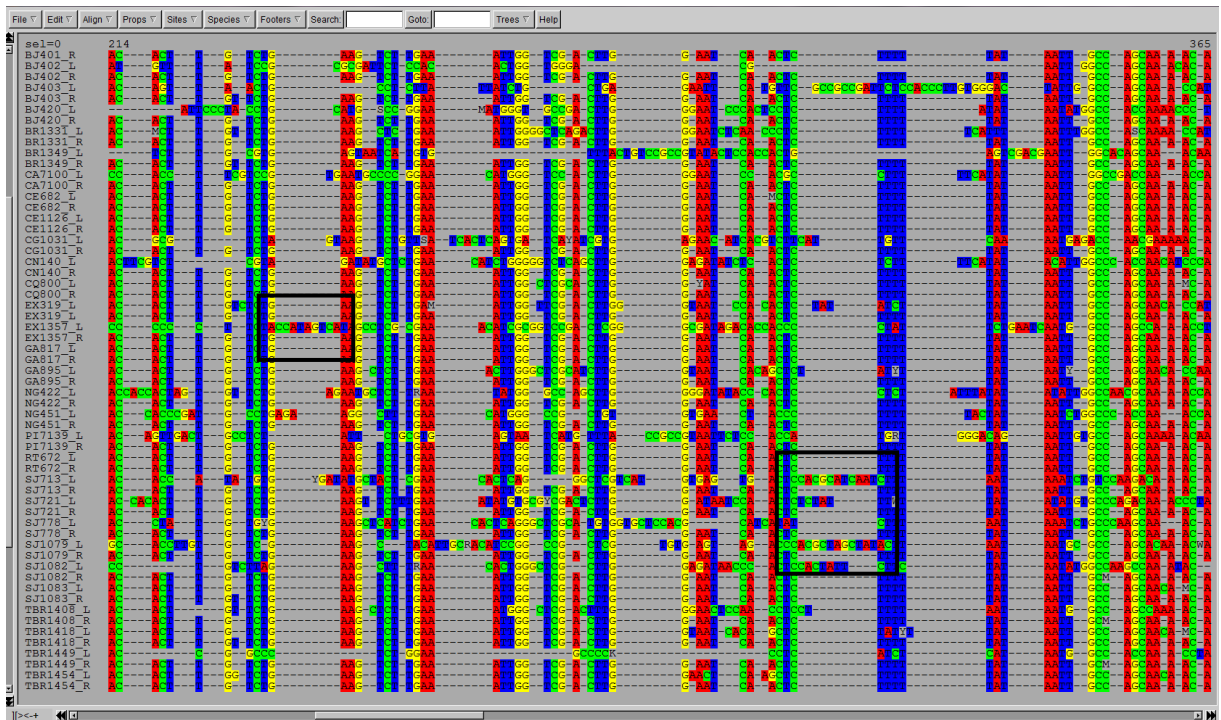
**Figura 16. Cromatograma sin ruido de fondo.**

En la parte inferior del cromatograma (rectángulo negro) se observa un bajo ruido de fondo. Lo que permite discriminar claramente cuál es el nucleótido que corresponde a cada pico.



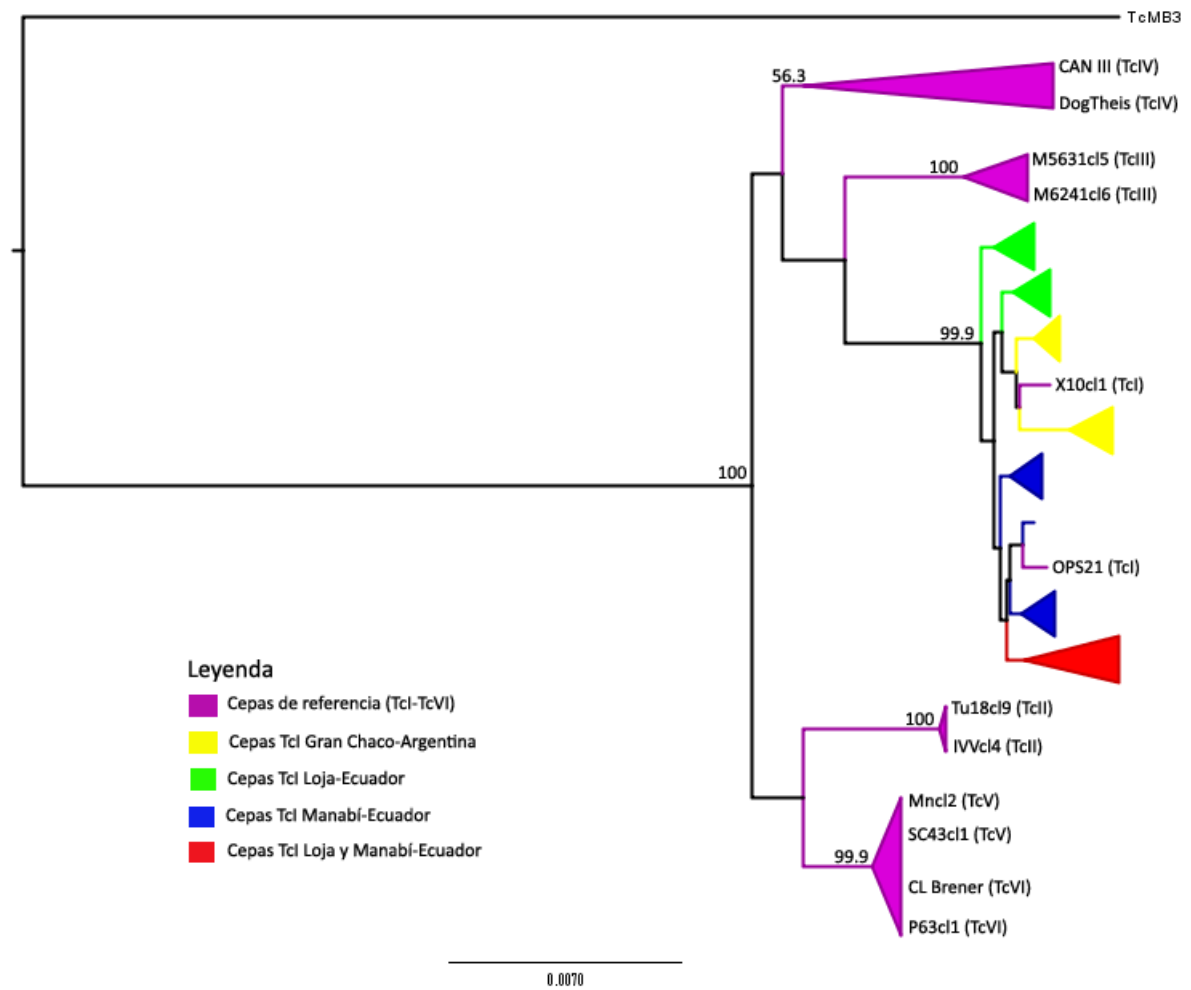
**Figura 17. Cromatograma con ruido de fondo.**

A diferencia de lo expuesto en la Figura 16, la presencia de ruido o artefactos (rectángulo negro) hace que la designación de los nucleótidos sea ambigua. En muchos casos se puede considerar a un pico, causado por el ruido de fondo, como un pico correspondiente a un nucleótido.



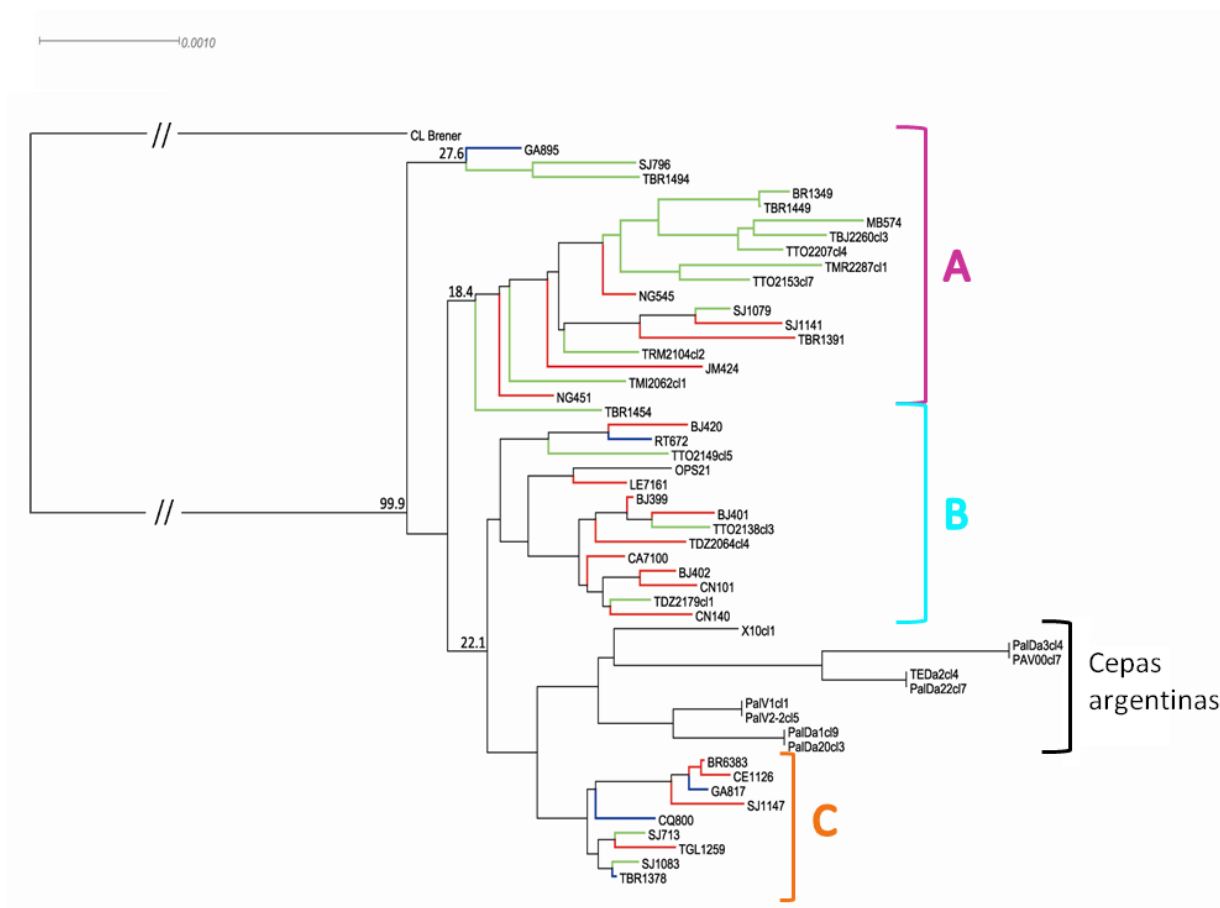
**Figura 18. Efecto del alineamiento de secuencias con ruido de fondo.**

El principal efecto que se obtiene al alinear secuencias que presentan un alto ruido de fondo es el exceso o falta de nucleótidos, y como consecuencia se forman espacios vacíos (rectángulos negros) entre las secuencias. Dentro de los genes seleccionados para el análisis, no hay la presencia de espacios en las secuencias.



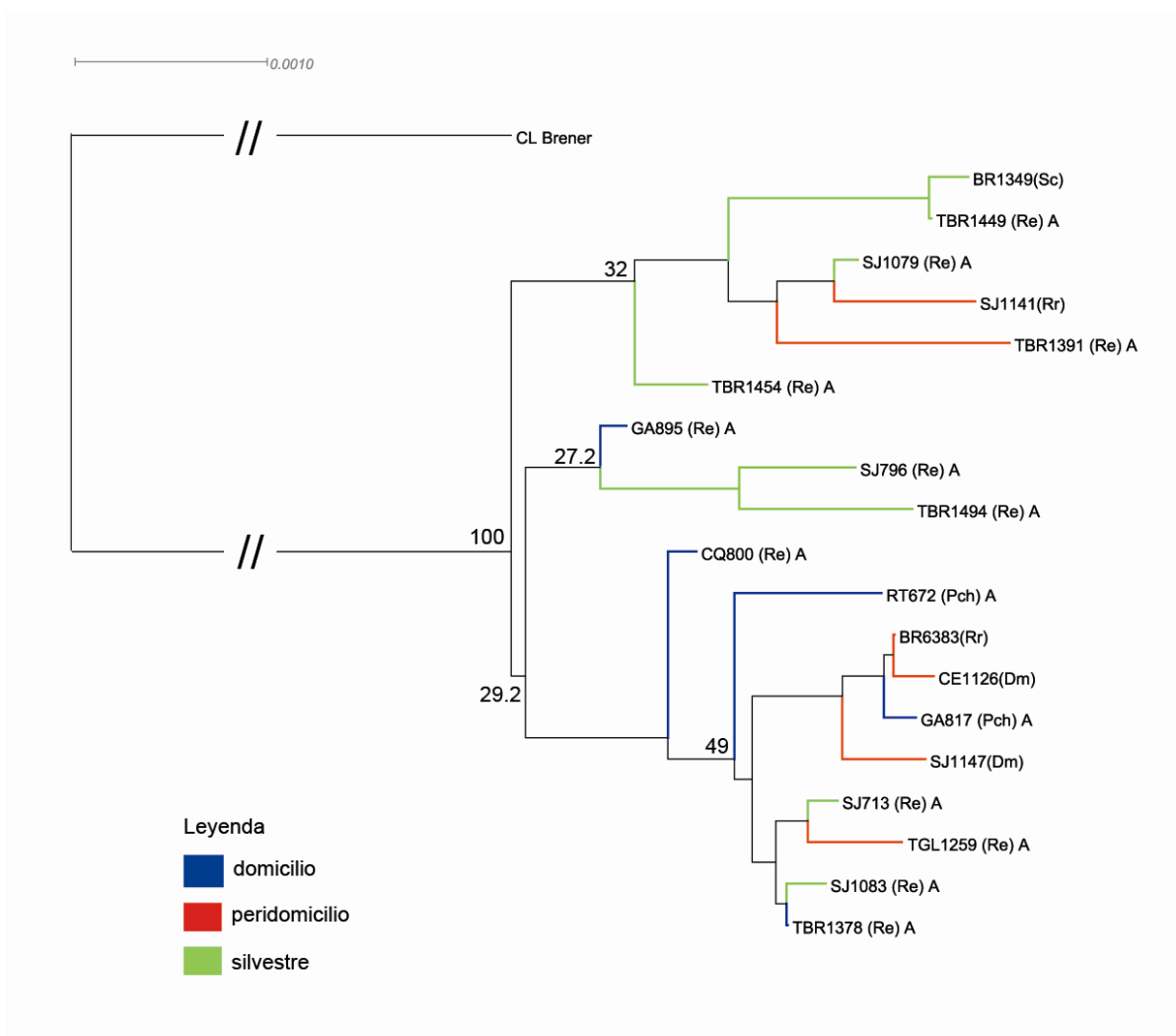
**Figura 19. Dendrograma de cepas referencia (TcI-TcVI), cepas TcI argentinas y ecuatorianas.**

El dendrograma fue elaborado utilizando el método de distancias Neighbor Joining (NJ), con el modelo p- corregida (estados intermedios) en el programa SplitsTree4. En color morado, cepas de referencia; color amarillo, cepas TcI argentinas y color verde, cepas TcI ecuatorianas. Se confirma que las cepas ecuatorianas corresponden al linaje TcI.



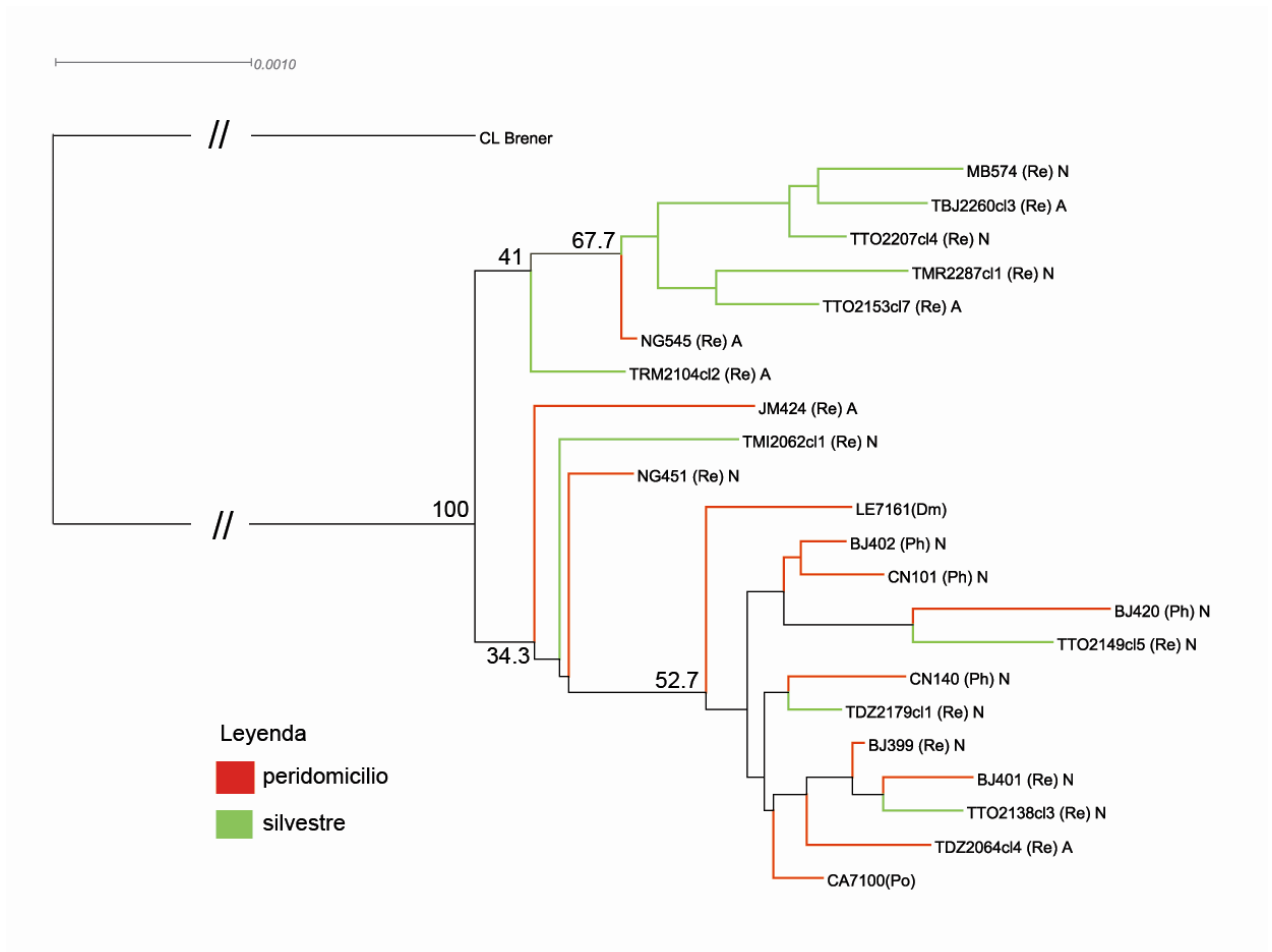
**Figura 20. Dendrograma de los aislados TcI de Argentina y Ecuador.**

El dendrograma fue elaborado utilizando el método de distancias Neighbor Joining (NJ), con el modelo p- corregida (estados intermedios) en el programa SplitsTree4. Los colores de las líneas representan el hábitat de captura: intradomicilio (azul), peridomicilio (rojo) y silvestre (verde). Se observa la formación de tres grupos: a) muestras silvestres tanto de Manabí como de Loja, b) muestras de peridomicilio de Manabí y c) un tercer grupo formado principalmente con las muestras de domicilio y peridomicilio de la provincia de Loja.



**Figura 21. Dendrograma con las cepas de la provincia de Loja.**

Se utilizó el método de distancias Neighbor Joining (NJ), con el modelo p- corregida (estados intermedios) en el programa SplitsTree4. Los colores de las líneas representan el hábitat de captura: intradomicilio (azul), peridomicilio (rojo) y silvestre (verde). Se indica el hospedero entre paréntesis: Dm, *Didelphis marsupialis*; Rr, *Rattus rattus*; Sc, *Sciurus stramineus*; Pch, *P. chinai*; Re, *R. ecuadoriensis* y el estadio: A, adulto. Se observa la formación de dos grupos principales: a) formado por las muestras selváticas y b) formado por las muestras de domicilio y peridomicilio. Se observa la presencia de muestras de peridomicilio en el grupo selvático y viceversa, lo que confirma que existe un flujo de parásitos entre ambos ambientes en la provincia de Loja.



**Figura 22. Dendrograma correspondiente a las cepas de la provincia de Manabí.**

Se utilizó el método de distancias Neighbor Joining (NJ), con el modelo p- corregida (estados intermedios) en el programa SplitsTree4. Los colores de las líneas representan el hábitat de captura: intradomicilio (azul), peridomicilio (rojo) y silvestre (verde). Los hospederos están entre paréntesis: Dm, *D. marsupialis*; Po, *Philander opossum*; Ph, *P. howardi*; Re, *R. ecuadoriensis* y el estadio: A, adulto; N, ninfa. Se observa la formación de dos grupos principales: a) formado por las muestras selváticas y b) formado por las muestras de peridomicilio. Se observa la presencia de muestras de peridomicilio en el grupo selvático y viceversa, lo que confirma que existe un flujo de parásitos entre ambos ambientes en la provincia de Manabí.

**10 TABLAS**

**Tabla 1. Comparación de la nueva nomenclatura con las clasificaciones generadas por la información proporcionada por diferentes marcadores**

<b>NUEVA NOMENCLATURA<sup>a</sup></b>	<b>MLEE<sup>b</sup></b>	<b>DTU<sup>c</sup></b>
<i>Trypanosoma cruzi</i> I (TcI)	Z1	DTU I
<i>Trypanosoma cruzi</i> II (TcII)	Z2	DTU IIb
<i>Trypanosoma cruzi</i> III (TcIII)	Z3/Z1	DTU IIc
<i>Trypanosoma cruzi</i> IV (TcIV)	Z3	DTU IIa
<i>Trypanosoma cruzi</i> V (TcV)	Z2 boliviano	DTU IId
<i>Trypanosoma cruzi</i> VI (TcVI)	Z2 paraguayo	DTU IIe

(a) Zingales *et al.*, 2009; (b) Miles *et al.*, 2009; (c) Brisse *et al.*, 2001. MLEE: Electroforesis de enzimas de multilocus, DTU: Discrete Typing Unit

**Tabla 2. Genes “housekeeping” y su función, correspondientes al esquema de la tipificación de secuencias de multilocus de *Trypanosoma cruzi***

Nombre del gen	Función
Glutación peroxidasa ( <i>gp</i> )	Metabolismo de peróxidos
3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa ( <i>coar</i> )	Cataliza la síntesis de ácido mevalónico en la biosíntesis del colesterol
Componente E1 subunidad alfa del piruvato deshidrogenasa ( <i>pdh</i> )	Cataliza la transformación del piruvato a Acetil-coenzima A
Proteína Rab 7 pequeña GTP-vinculado ( <i>gtp</i> )	Reguladores en el tráfico de la membrana intracelular y transporte, por la formación de vesículas
Proteína fosfatasa serina/treonina PP1 ( <i>sttp-frag2</i> )	Fosforilación de proteínas (residuos de serina y treonina)
Proteína GTP-vinculadora tipo Rho ( <i>rl-gtp</i> )	Regulación del citoesqueleto y secreción celular de mastocitos
Glucosa- 6- fosfato isomerasa ( <i>gpi</i> )	Participa en la glicólisis y gluconeogénesis
Superóxido dismutasa A ( <i>tcsoda</i> )	Catalizan la dismutación de los superóxidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno
Superóxido dismutasa B ( <i>tcsodb</i> )	Catalizan la dismutación de los superóxidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno
Aminopeptidasa leucina ( <i>lap</i> )	Catalizan la hidrólisis de los residuos de leucina de péptidos y proteínas

**Tabla 3. Información geográfica de las comunidades de las provincias de Loja y Manabí, de donde provienen las muestras analizadas en este estudio**

<b>Comunidad</b>	<b>Código</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Longitud</b>	<b>Latitud</b>	<b>Rango de altura (m)</b>
Bramaderos	BR	Loja	Paltas	-79,8223	-4,0793	850-1320
Chaquizhca	CQ	Loja	Paltas	-79,5901	-4,2326	991-1930
Coamine	CE	Loja	Paltas	-79,6112	-4,1294	955-1628
Galápagos	GL	Loja	Quilanga	-79,4344	-4,3523	1200-1400
Guara	GA	Loja	Calvas	-79,5798	-4,2501	1035-1325
Jurupe	JU	Loja	Calvas	-79,5185	-4,1864	1600-1860
La Ciénega	CG	Loja	Célica	-80,0995	-4,2100	580-870
La Extensa	EX	Loja	Catamayo	-79,3618	-4,0395	1207-1295
Sabanilla	SA	Loja	Paltas	-79,7657	-4,0379	870-925
San Jacinto	SJ	Loja	Gonzanamá	-79,3536	-4,0921	987-1230
Santa Ester	ST	Loja	Gonzanamá	-79,5582	-4,1239	1070-1206
Santa Rita	RT	Loja	Gonzanamá	-79,3472	-4,1143	987-1230
Chande	CD	Manabí	Jipijapa	-80,5323	-1,3203	305-482
Cruz Alta	CA	Manabí	Portoviejo	-80,2776	-0,9950	105-250
Danzarín	DZ	Manabí	Rocafuerte	-80,3345	0,9297	114-170
El Bejuco	BJ	Manabí	Portoviejo	-80,3470	-0,9721	65-400
Jesús María	JM	Manabí	Portoviejo	-80,2248	-1,0270	75-130
La Ciénega	CN	Manabí	Portoviejo	-80,3590	-1,0200	52
La Encantada	LE	Manabí	Portoviejo	-80,3519	-0,9923	19-290
Liguiqui	LG	Manabí	Manta	-80,8847	-1,0335	46-156
Maconta						
Abajo	MB	Manabí	Portoviejo	-80,3733	-1,0830	68-144
Mariscal						
Sucre	MR	Manabí	Jipijapa	-80,5418	-1,4389	354-377
Moralito	MI	Manabí	Junín	-80,1918	-0,9400	53-74
Pimpiguasí	PI	Manabí	Portoviejo	-80,3681	-1,1399	24-70
San Gabriel						
(Zapallo)	ZL	Manabí	Portoviejo	-80,3792	-1,0127	56
San Gregorio	NG	Manabí	Portoviejo	-80,2373	-1,0310	74-220
San Ramón	RM	Manabí	Sucre	-80,4360	-0,7899	76-223
Tablada del						
Algodón	TO	Manabí	Junín	-80,1987	-0,9775	398-466

**Tabla 4. Lista de los genes, primer y secuencias utilizados para la tipificación mediante secuenciación de multilocus (MLST)**

No	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Peso molecular esperado (pb)
1	Gp-Left Gp-Right	CGT GGC ACT CTC CAA TTA CA AAT TTA ACC AGC GGG ATG C	360
2	CoAr-Left CoAr-Right	AGG AGG CTT TTG AGT CCA CA TCC AAC AAC ACC AAC CTC AA	554
3	Pdh-L Pdh-R	GGG GCA AGT GTT TGA AGC TA AGA GCT CGC TTC GAG GTG TA	491
4	Gtp-Left Gtp-Right	TGT GAC GGG ACA TTT TAC GA CCC CTC GAT CTC ACG ATT TA	561
5	Sttp-frag2-Left Sttp-frag2-Right	CCG TGA AGC TTT TCA AGG AG GCC CCA CTG TTC GTA AAC TC	409
6	RL-Gtp-Left RL-Gtp-Right	AGT TGC TGC TTC CCA TCA AT CTG CAC AGT GTA TGC CTG CT	455
7	Gpi-Left Gpi-Right	CGC CAT GTT GTG AAT ATT GG GGC GGA CCA CAA TGA GTA TC	405
8	TcSODAd TcSODAr	CCA CAA GGC GTA TGT GGA C ACG CAC AGC CAC GTC CAA	300
9	TcSODBd TcSODBr	GCC CCA TCT TCA ACC TT TAG TAC GCA TGC TCC CAT A	335
10	Lap-1 Lap-2	TGT ACA TGT TGC TTG GCT GAG GCT GAG GTG ATT AGC GAC AAA	420

**Tabla 5. Clave de representación de los nucleótidos, por letra y color.** Utilizados para la interpretación de los cromatogramas de secuenciación. Se señala también la representación de los sitios heterocigotos (sitios ambiguos).

Modificado de <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>

<b>Código</b>	<b>Descripción</b>	<b>Color</b>
A	Adenina	Verde
C	Citosina	Azul
G	Guanina	Negro
T	Timina	Rojo
U	Uracilo	
R	Purina (A o G)	
Y	Pirimidina (C o A)	
M	C o A	
K	T, U o G	
W	T, U o A	
S	C o G	
N	cualquier nucleótido	

**Tabla 6. Resultado de la caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* de las provincias de Loja y Manabí**

No	Código de laboratorio	Hospedero	E	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>gpi</i>	24Sa ARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
1	BJ623	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
2	SJ728	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
3	SJ752	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
4	SJ774	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	peridomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
5	JQ802	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Jacapo	Quilanga	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
6	SJ834	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
7	GA843	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
8	GA896	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio	462pb	817/447pb	n.a	TcI
9	CQ902	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Chaquizhca	Calvas	Loja	selvático	462pb	817/447pb	110pb	TcI
10	SJ1123	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
11	SJ1125	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	n.a	TcI
12	SJ1128	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI

**Tabla 6. Resultado de la caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* de las provincias de Loja y Manabí (continuación...)**

No	Código de laboratorio	Hospedero	E	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>gpi</i>	24Sa ARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
13	SJ1130	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
14	SJ1205	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
15	EX1243	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	La Extensa	Catamayo	Loja	intradomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
16	TBR1445	<i>R. ecuadoriensis</i>	III	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	n.a	TcI
17	TBR1446	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
18	TBR1491	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
19	TBR1494	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
20	TBR1487	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
21	TTO1994	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Tablada del algodón	Junín	Manabí	intradomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
22	TMI2062c11	<i>R. ecuadoriensis</i>	III	Moralito	Junín	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
23	TDZ2064c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	peridomicilio	462pb	817/447pb	110pb	TcI
24	TRM2104c12	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Ramón	Sucre	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI

**Tabla 6. Resultado de la caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* de las provincias de Loja y Manabí (continuación)**

No	Código de laboratorio	Hospedero	E	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>gpi</i>	24Sa ARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
25	TBJ2129c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
26	TTO2138c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
27	TTO2149c15	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
28	TTO2153c17	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
29	TDZ2179c11	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
30	TTO2207c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
31	TRM2225c15	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Ramón	Sucre	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
32	TBJ2260c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
33	TMR2287c11	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Mariscal Sucre	Jipijapa	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
34	TCD2299c12	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Chande	Jipijapa	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	110pb	TcI
35	TLG2348c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Liguiqui	Manta	Manabí	silvestre	462pb	817/447pb	n.a	TcI

**Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí**

No	Código campo	Código laboratorio	Hospedero	E	Comunidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura
1	TJU034	TJU1289	<i>T. carrioni</i>	H	Jurupe	Calvas	Loja	intradomicilio
2	TJU030	TJU1285	<i>T. carrioni</i>	M	Jurupe	Calvas	Loja	intradomicilio
3	TBR123	TBR1378	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	intradomicilio
4		GA817	<i>P. chinai</i>	M	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio
5		CE682	<i>P. chinai</i>	M	Coamine	Paltas	Loja	intradomicilio
6		RT672	<i>P. chinai</i>	M	Santa Rita	Gonzanamá	Loja	intradomicilio
7		CQ800	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Chaquizhca	Calvas	Loja	intradomicilio
8		EX320	<i>P. chinai</i>	III	La Extensa	Catamayo	Loja	intradomicilio
9		EX319	<i>P. chinai</i>	V	La Extensa	Catamayo	Loja	intradomicilio
10	TST216	TST1471	<i>P. chinai</i>	M	Santa Ester	Gonzanamá	Loja	intradomicilio
11	TJU095	TJU1350	<i>T. carrioni</i>	II	Jurupe	Calvas	Loja	intradomicilio
12	TBR112	TBR1367	<i>P. chinai</i>	H	Bramaderos	Paltas	Loja	intradomicilio
13		GA843	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio
14		GA895	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio
15		CG1232	<i>Rattus rattus</i>		La Ciénega	Celica	Loja	intradomicilio
16	TGL004	TGL1259	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Galápagos	Quilanga	Loja	peridomicilio
17	TSA170	TSA1425	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Sabanilla	Paltas	Loja	peridomicilio
18	TBR136	TBR1391	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	peridomicilio
19		6383	<i>Rattus rattus</i>		Bramaderos	Paltas	Loja	peridomicilio
20		SJ1147	<i>Didelphis marsupialis</i>		San Jacinto	Gonzanamá	Loja	peridomicilio
21		CE1126	<i>Didelphis marsupialis</i>		Coamine	Paltas	Loja	peridomicilio

**Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí (continuación...)**

No	Código campo	Código laboratorio	Hospedero	E	Comunidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura
22		SJ1141	<i>Rattus rattus</i>		San Jacinto	Gonzanamá	Loja	peridomicilio
23		SJ778	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
24		SJ713	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
25		SJ1083	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
26	TBR199	TBR1454	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
27	TBR163	TBR1418	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
28	TBR153	TBR1408	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
29		SJ1079	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
30		SJ721	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
31	TBR215	TBR1470	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
32		CG1031	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	La Ciénega	Celica	Loja	silvestre
33	TGL032	TGL1287	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre
34	TBR194	TBR1449	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
35		BR1331	<i>Didelphis marsupialis</i>		Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
36		SJ1162	<i>Rattus rattus</i>		San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
37		BR1349	<i>Sciurus stramineus</i>		Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
38		SJ728	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
39		SJ834	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
40		SJ1123	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
41		SJ1082	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
42		SJ1130	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre
43		SJ796	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre

**Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí (continuación...)**

No	Código campo	Código laboratorio	Hospedero	E	Comunidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura
44	TBR150	TBR1405	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
45	TBR191	TBR1446	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
46	TBR237	TBR1492	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
47	TBR239	TBR1494	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre
48		TTO1994	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Tablada del algodón	Junín	Manabí	intradomicilio
49		BJ420	<i>P. howardi</i>	III	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
50		CN140	<i>P. howardi</i>	V	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
51		BJ402	<i>P. howardi</i>	V	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
52		CN101	<i>P. howardi</i>	V	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
53		CN103	<i>P. howardi</i>	II	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
54		ZL441	<i>P. howardi</i>	II	San Gabriel (Zapallo)	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
55		NG451	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
56		BJ403	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
57		MB374	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
58		ZL454	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Gabriel (Zapallo)	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
59		NG422	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
60		BJ434	<i>R. ecuadoriensis</i>	II	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
61		ZL411	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Gabriel (Zapallo)	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
62		ZL415	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Gabriel (Zapallo)	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
63		BJ399	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
64		BJ401	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio

**Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí (continuación...)**

No	Código campo	Código laboratorio	Hospedero	E	Comunidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura
65		CA7100	<i>Philander opossum</i>		Cruz Alta	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
66		PI7139	<i>Didelphis marsupialis</i>		Pimpiguasí	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
67		LE7161	<i>Didelphis marsupialis</i>		La Encantada	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
68		LE7148	<i>Didelphis marsupialis</i>		La Encantada	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
69		PI7137	<i>Didelphis marsupialis</i>		Pimpiguasí	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
70		BJ623	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
71		TDZ2064c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	peridomicilio
72		BJ468	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
73		MB573	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
74		JM424	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Jesús María	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
75		NG545	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio
76		TTO2149c15	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre
77		BJ456	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	silvestre
78		MB572	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
79		MB565	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
80		MB574	<i>R. ecuadoriensis</i>	II	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
81		MB564	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
82		MB561	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
83		MB567	<i>R. ecuadoriensis</i>	III	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
84		MB562	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre
85		TMI2062c11	<i>R. ecuadoriensis</i>	III	Moralito	Junín	Manabí	silvestre

**Tabla 7. Listado de cepas seleccionadas para la secuenciación con los genes de la tipificación de secuencias de multilocus de la provincia de Loja y Manabí (continuación.)**

No	Código campo	Código laboratorio	Hospedero	E	Comunidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura
86		TRM2104c12	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Ramón	Sucre	Manabí	silvestre
87		TTO2138c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre
88		TDZ2179c11	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	silvestre
89		TBJ2260c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	H	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	silvestre
91		TCD2299c12	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Chande	Jipijapa	Manabí	silvestre
92		TLG2348c13	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Liguiqui	Manta	Manabí	silvestre
93		TBJ2129c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	IV	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	silvestre
94		TRM2225c15	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	San Ramón	Sucre	Manabí	silvestre
95		TTO2153c17	<i>R. ecuadoriensis</i>	M	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre
96		TTO2207c14	<i>R. ecuadoriensis</i>	V	Tablada del algodón	Junín	Manabí	silvestre

**Tabla 8. Resumen del proceso de obtención y selección de muestras en este estudio**

Provincia	Comunidad	casa/punto revisado	casa/punto positivo	Hábitat	No. TC	No. TA	No. TP	No. C/PP	No. MST	No. MA	No. MP	No. MSM	
Loja	Bramaderos	61	13	domicilio	771	8	6	5	2	11	1	0	
				peridomicilio									49
		66	27	silvestre	273	85	58	21	9	4	4	4	2
	Chaquizhca	31	15	domicilio	70	21	3	3	1	0	0	0	0
				peridomicilio									
		73	15	silvestre	98	23	13	6	0	0	0	0	0
	Coamine	46	11	domicilio	1479	37	1	1	1	1	21	4	0
				peridomicilio									
		67	1	silvestre	6	6	6	1	0	13	1	0	0
	Galápagos	34	10	domicilio	733	5	0	0	0	0	10	2	0
				peridomicilio									
		117	14	silvestre	150	42	18	8	1	13	2	0	0
Guara	22	8	domicilio	593	49	15	3	3	0	0	0	0	
			peridomicilio										11
Jurupe	30	10	domicilio	44	26	5	4	3	0	0	0	0	
			peridomicilio										18

TC: triatomos colectados; TA: triatomos analizados; TP: triatomos positivos; C/PP: casa/punto diferentes proviene muestra; MST: muestra seleccionada triatomos; MA: mamíferos analizados; MP: mamíferos positivos; MSM: muestras mamíferos seleccionados; \*: faltan resultados de PCR; n.d: no determinado.

**Tabla 8. Resumen del proceso de obtención y selección de muestras en este estudio (continuación...)**

Provincia	Comunidad	casa/punto revisado	casa/punto positivo	Hábitat	No. TC	No. TA	No. TP	No. C/PP	No. MST	No. MA	No. MP	No. MSM
Loja	La Ciénega	42	11	domicilio	531	2	0	0	0	15	5	1
				peridomicilio				0	0	13	5	0
		144	25	silvestre	390	15	8	6	1	18	11	0
	La Extensa	47	5	domicilio	397	15	3	2	2	25	2	0
				peridomicilio				8	0	0	5	1
		41	3	silvestre	3	3	1	1	0	6	1	0
	Sabanilla	26	2	peridomicilio	15	6	2	1	1	0	0	0
	San Jacinto	11	1	peridomicilio	70	3	1	1	0	5	1	2
		190	33	silvestre	673	96	76	20	11	25	7	1
	Santa Ester	27	8	domicilio	45	5	1	1	1	0	0	0
Santa Rita	20	1	domicilio	1	1	1	1	1	6	1	0	
Manabí	Chande	59	6	domicilio	93	1	*	n.d.	0	0	0	0
				peridomicilio			28	*	n.d.	0	0	0
		49	20	silvestre	602	83	24	8	1	0	0	0
	Cruz Alta	114	8	peridomicilio	95	1	1	1	0	43	7	1

TC: triatominos colectados; TA: triatominos analizados; TP: triatominos positivos; C/PP: casa/punto diferentes proviene muestra; MST: muestra seleccionada triatominos; MA: mamíferos analizados; MP: mamíferos positivos; MSM: muestras mamíferos seleccionados; \*: faltan resultados de PCR; n.d: no determinado.

**Tabla 8. Resumen del proceso de obtención y selección de muestras en este estudio (continuación...)**

Provincia	Comunidad	casa/punto revisado	casa/punto positivo	Hábitat	No. TC	No. TA	No. TP	No. C/PP	No. MST	No. MA	No. MP	No. MSM
Manabí	Danzarín	32	7	peridomicilio	167	45	2	2	1	0	0	0
		36	20	silvestre	432	59	6	6	1	0	0	0
	El Bejuco	72	9	domicilio	96	6	3	3	0	0	0	0
				peridomicilio		132	79	18	8	0	0	0
		71	5	silvestre	55	112	72	29	3	36	1	0
	Jesús María	38	4	peridomicilio	118	6	3	2	1	0	0	0
	La Ciénega	84	6	peridomicilio	193	16	10	1	3	0	0	0
	La Encantada	123	4	peridomicilio	374	6	0	0	0	24	5	2
	Liguiqui	49	4	domicilio	5	0	0	0	0	0	0	0
		21	10	silvestre	235	27	10	6	1	0	0	0
	Maconta Abajo	38	7	peridomicilio	81	24	3	3	2	0	0	0
				silvestre		22	12	7	7	0	0	0
	Mariscal Sucre	40	1	peridomicilio	12	5	*	n.d.	0	0	0	0
		40	14	silvestre	129	41	14	7	1	0	0	0
	Moralito	23	7	silvestre	32	17	3	3	1	0	0	0

TC: triatomino colectados; TA: triatomino analizados; TP: triatomino positivos; C/PP: casa/punto diferentes proviene muestra; MST: muestra seleccionada triatomino; MA: mamíferos analizados; MP: mamíferos positivos; MSM: muestras mamíferos seleccionados; \*: faltan resultados de PCR; n.d: no determinado.

**Tabla 8. Resumen del proceso de obtención y selección de muestras en este estudio (continuación.)**

Provincia	Comunidad	casa/punto revisado	casa/punto positivo	Hábitat	No. TC	No. TA	No. TP	No. C/PP	No. MST	No. MA	No. MP	No. MSM
Manabí	Pimpiguasí	116	6	peridomicilio	230	1	0	0	0	30	8	2
	San Gabriel (Zapallo)	93	4	peridomicilio	560	26	16	n.d.	4	0	0	0
	San Gregorio	39	6	peridomicilio	61	15	6	5	3	0	0	0
	San Ramón	58	4	domicilio	16	7	*	n.d.	0	0	0	0
				peridomicilio		1	*	n.d.	0	0	0	0
		38	8	silvestre	146	7	2	1	2	0	0	0
	Tablada del Algodón	38	7	domicilio	193	24	1	1	1	0	0	0
				peridomicilio		22	2	1	0	0	0	0

TC: triatominos colectados; TA: triatominos analizados; TP: triatominos positivos; C/PP: casa/punto diferentes proviene muestra; MST: muestra seleccionada triatominos; MA: mamíferos analizados; MP: mamíferos positivos; MSM: muestras mamíferos seleccionados; \*: faltan resultados de PCR; n.d: no determinado.

**Tabla 9. Variabilidad correspondiente a los diez genes de la tipificación de secuencias de multilocus utilizados en este estudio**

<b>Gen</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Número de polimorfismo</b>	<b>Número de genotipos</b>	<b>DP</b>
<i>coar</i>	56	16	29	0,90
<i>gp</i>	82	5	15	0,82
<i>gpi</i>	14	3	5	0,59
<i>gtp</i>	8	3	4	0,75
<i>pdh</i>	71	5	14	0,88
<i>rl-gtp</i>	84	8	16	0,88
<i>sttp-frag2</i>	88	2	4	0,57
<i>tcsodb</i>	86	5	7	0,53
<i>tcsoda</i>	87	0	1	0,00
<i>lap</i>	0	0	0	0,00

DP=Poder discriminatorio

Tabla 10. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *coar*

Genotipo	(# cepas)	posiciones/polimorfismos															
		7	42	100	121	130	187	194	202	214	236	256	277	313	379	415	427
1	17	T	A	C	C	G	G	G	C	A	G	C	A	T	C	A	G
2	4	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.
3	1	.	.	T	.	.	A	S	.	G	.	.	.	C	.	.	.
4	1	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	R
5	1	.	W	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	R
6	1	.	.	Y	.	.	A	.	.	R	.	.	R	.	.	.	.
7	2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	1	.	.	Y	.	.	A	.	.	G	.	Y	R	.	.	.	.
9	4	.	.	T	.	.	A	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.
10	1	.	.	.	.	.	R	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.
11	1	.	.	T	.	.	A	.	.	G	K	.	G	.	.	.	.
12	2	.	.	Y	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	1	.	.	Y	.	.	R	.	.	R	.	.	R	.	.	.	.
14	1	.	.	.	Y	.	.	S	.	.	.	.	.	.	Y	.	.
15	2	.	.	Y	.	.	R	.	.	R	.	.	.	Y	.	.	.
16	1	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	1	A	.	Y	.	.	R	.	.	R	.	.	.	Y	.	.	.
18	1	.	.	Y	Y	.	A	.	.	R	.	.	.	Y	Y	.	.
19	3	.	.	T	.	.	A	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.
20	1	.	W	T	.	.	A	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.
21	1	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
22	1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.
23	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.
24	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R
25	1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.
26	1	.	.	Y	Y	.	R	.	.	R	.	.	R	.	Y	.	.
27	1	.	.	Y	.	A	R	.	.	R	.	.	R	.	.	.	.
28	1	.	.	.	Y	A	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.
29	1	.	.	Y	.	.	R	.	.	G	.	Y	R	.	.	.	.

Total 56

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 11. Tabla 11. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *gp***

Genotipo	# cepas	posiciones/polimorfismos				
		39	206	227	237	248
1	12	C	G	G	A	T
2	1	.	.	K	.	.
3	22	.	A	.	.	C
4	6	.	R	.	.	.
5	1	.	A	K	.	C
6	4	.	A	T	.	C
7	7	.	A	.	.	.
8	14	.	A	.	.	Y
9	1	.	R	.	R	.
10	4	.	R	K	.	Y
11	1	.	.	K	.	Y
12	5	.	A	K	.	Y
13	1	.	R	K	.	.
14	2	Y	A	.	.	Y
15	1	.	R	.	.	Y
Total		82				

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 12. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *gpi***

Gentipo	# cepas	posiciones/ polimorfismos		
		4	182	209
1	9	G	C	T
2	2	.	.	Y
3	1	.	A	.
4	1	.	A	Y
5	1	C	.	.
Total		14		

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigoto

**Tabla 13. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *gtp***

Genotipo	# cepas	posiciones/ polimorfismos		
		6	227	339
1	4	C	Y	A
2	1	A	C	G
3	1	A	C	R
4	2	.	C	G
Total		8		

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 14. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *pdh***

Genotipo	# cepas	posiciones/polimorfismos				
		158	164	173	254	365
1	3	Y	A	Y	C	C
2	1	.	W	T	.	.
3	14	C	.	C	.	.
4	5	C	.	C	Y	.
5	6	C	.	C	T	T
6	16	C	.	C	T	.
7	6	T	T	T	.	.
8	6	.	W	Y	.	.
9	3	C	.	.	T	T
10	1	.	W	.	Y	.
11	6	C	.	C	T	Y
12	2	C	.	.	T	Y
13	1	C	.	.	Y	.
14	1	.	.	C	.	.
Total		71				

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 15. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *rl-gtp***

Genotipo	# cepas	posiciones/polimorfismos							
		1	56	77	134	144	153	165	288
1	10	A	C	C	C	C	C	T	R
2	18	.	.	.	.	.	.	.	A
3	4	.	.	.	.	.	.	.	G
4	3	G	.	.	.	.	.	.	G
5	15	.	.	.	.	.	.	.	A
6	13	G	.	.	.	.	.	.	.
7	4	G	.	.	.	.	.	.	A
8	2	.	.	Y	Y	.	.	.	A
9	4	.	.	T	.	.	.	.	A
10	2	.	.	.	.	Y	.	.	A
11	1	G	.	.	Y	.	.	.	A
12	4	.	.	.	T	.	.	.	A
13	1	.	.	.	Y	.	Y	.	A
14	1	.	.	.	Y	.	.	W	A
15	1	.	Y	Y	Y	.	.	.	A
16	1	.	Y	.	T	.	.	.	A

Total 84

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 16. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *sttp-frag2***

Genotipo	# cepas	posiciones/ polimorfismos	
		154	266
1	21	G	A
2	52	.	G
3	14	.	R
4	1	K	.

Total 88

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 17. Resumen de los polimorfismos y su posición en el gen *tcsodb***

Genotipos	# cepas	posiciones/polimorfismos				
		13	128	159	188	200
1	57	C	C	G	M	C
2	9	.	.	.	C	.
3	1	.	.	.	A	.
4	6	.	M	.	.	.
5	11	Y	.	.	.	.
6	1	.	.	.	C	S
7	1	.	.	K	.	.
Total		86				

R, S, W, Y, K, M: sitios heterocigotos

**Tabla 18. Posiciones dentro de las secuencias de cada gen que presentan sitios homocigotos y heterocigotos**

Gen	Posición (heterocigotos/homocigotos)							Tamaño (pb)
<i>coar</i>	100	121	187	214	277	313	379	480
<i>gp</i>	206	227	248					285
<i>gtp</i>	339							497
<i>pdh</i>	158	164	173	254	365			406
<i>rl-gtp</i>	77	134	288					376
<i>sttp-frag2</i>	266							311
<i>tcsodb</i>	188							259

**Tabla 19. Información de los perfiles alélicos y secuencias diploides tipo de cada uno de los genes usados en los análisis filogenéticos**

No	Código	perfiles alélicos							DST
		<i>stp-frag2</i>	<i>coar</i>	<i>gp</i>	<i>pdh</i>	<i>rl-gtp</i>	<i>tcsoda</i>	<i>tcsodb</i>	
1	BJ399	1	1	1	1	1	1	1	1
2	BJ401	1	1	1	2	2	1	1	2
3	BJ402	1	2	1	3	3	1	1	3
4	BJ420	2	2	2	3	4	1	2	4
5	BR6383	3	1	2	4	5	1	1	5
6	BR1349	3	3	2	5	6	1	1	6
7	CA7100	1	1	3	3	3	1	1	7
8	CE1126	3	1	2	4	5	1	2	8
9	CN101	1	4	1	3	2	1	1	9
10	CN140	1	5	1	3	1	1	1	10
11	CQ800	3	1	2	6	7	1	1	11
12	GA817	3	1	2	4	7	1	1	12
13	GA895	3	2	2	5	7	1	1	13
14	JM424	1	6	3	5	6	1	3	14
15	LE7161	3	7	1	7	1	1	1	15
16	MB574	3	8	4	8	8	1	1	16
17	NG451	2	9	5	7	2	1	1	17
18	NG545	3	10	4	5	2	1	1	18
19	RT672	2	1	2	3	4	1	4	19
20	SJ713	1	1	2	9	5	1	4	20
21	SJ796	3	11	2	10	2	1	5	21
22	SJ1079	3	12	6	10	9	1	5	22
23	SJ1083	2	13	2	9	5	1	1	23
24	SJ1141	3	14	6	10	6	1	5	24
25	SJ1147	2	1	2	4	4	1	4	25
26	TBJ2260cl3	3	15	7	8	6	1	1	26
27	TBR1378	2	1	2	9	5	1	1	27
28	TBR1391	3	16	8	11	10	1	5	28
29	TBR1449	3	17	2	5	6	1	1	29
30	TBR1454	3	12	6	12	1	1	1	30
31	TBR1494	3	18	8	11	2	1	5	31
32	TDZ2179cl1	1	19	1	3	1	1	1	32
33	TDZ2064cl4	2	20	3	1	3	1	1	33
34	TGL1259	1	21	2	9	5	1	1	34
35	TMI2062cl1	2	22	9	7	1	1	1	35
36	TMR2287cl1	3	23	7	5	11	1	2	36
37	TRM2104cl2	3	9	9	8	6	1	1	37
38	TTO2138cl3	1	7	1	9	1	1	1	38

**Tabla 19. Información de los perfiles alélicos y secuencias diploides tipo de cada uno de los genes usados en los análisis filogenéticos (continuación.)**

No	Código	perfiles alélicos						DST	
		<i>sttp-frag2</i>	<i>coar</i>	<i>gp</i>	<i>pdh</i>	<i>rl-gtp</i>	<i>tcsoda</i>		<i>tcsodb</i>
39	TTO2149c15	1	24	2	3	1	1	4	39
40	TTO2153c17		25	7	5	2	1	2	3
41	TTO2207c14	3	15	4	5	2	1	6	41
No. polimorfismos		1	15	3	5	6	0	4	
DP		0,62	0,92	0,80	0,89	0,88	0,00	0,57	1,00

DST (secuencias diploides tipo)

DP (poder discriminatorio)

**Tabla 20. Número de muestras analizadas por provincia**

Provincia	No. Cepas analizadas	Genes analizados
Loja	19	<i>coar, gp, pdh, rl-gtp, sttp-frag2, tcsodb</i> y <i>tcsoda</i>
Manabí	22	<i>coar, gp, pdh, rl-gtp, sttp-frag2, tcsodb</i> y <i>tcsoda</i>
Total	41	

## **11 ANEXOS**

### Anexo 1. Preparación de medio de cultivo “liver infusion triptose”, LIT para cultivos de *Trypanosoma cruzi*

Para la preparación del medio de cultivo LIT, se debe colocar las siguientes cantidades, dependiendo del volumen que se vaya a preparar en un frasco previamente autoclavado:

<b>Reactivo</b>	<b>2L</b>	<b>1L</b>	<b>0,50 L</b>	<b>0,25 L</b>
Liver infusion Broth (Difco)	50,00 gr	25,00 gr	12,5 gr	6,25 gr
Triptose (Difco)	10,00 gr	5,00 gr	2,50 gr	1,25 gr
Cloruro de sodio	8,00 gr	4,00 gr	2,00 gr	1,00 gr
Cloruro de potasio	0,80 gr	0,40 gr	0,20 gr	0,10 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,00 gr	8,00 gr	4,00 gr	2,00 gr
Dextrosa	4,00 gr	2,00 gr	1,00 gr	0,50 gr
Agua destilada	2000 ml	1000 ml	500 ml	250 ml
Hemina 25mg/ml	2,00 ml	1,00 ml	0,50 ml	0,25 ml

Luego, se debe ajustar el pH a 7,4, usando NaOH 1M o HCl 12M concentrado. Este medio se etiqueta como LIT incompleto y se autoclava por 30 min a 121°C. Una vez que el medio de cultivo alcance la temperatura ambiente y bajo condiciones de esterilidad, se complementa con los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>2L</b>	<b>1L</b>	<b>0,50 L</b>	<b>0,25 L</b>
Penicilina/streptomycin 0.1% (10000 unidades pen/ml; 10 mg strep/ml)	2 ml	1 ml	0,50 ml	0,25 ml
Gentamicina 0.1% (50 mg/ml)	2 ml	1 ml	0,50 ml	0,25 ml
FBS inactivado*	100 ml	50 ml	25 ml	12,50 ml

\*Antes de usarlo, se incubó a 56°C por 30 minutos

El cultivo debe finalmente, ser etiquetado como LIT completo, con la fecha de preparación y las iniciales del personal responsable. El medio de cultivo LIT puede ser almacenado a 4°C por 3 meses.

## Anexo 2. Preparación de medio de cultivo bifásico para aislamiento de cultivos de *Trypanosoma cruzi*

### a) Preparación de soluciones:

Para preparar el medio de cultivo bifásico, primero se debe preparar las siguientes soluciones:

- **Tripticasa peptona:** en un frasco se colocó 17,5 gr en 100mL de agua destilada y se mezcló con agitación. Luego, se autoclavó, se dejó enfriar y se etiquetó con el nombre, fecha y responsable. Esta solución se debe mantener a 4°C.

- **5-fluorocitosina:** Se colocó 0,2 gr en 20ml de agua destilada en un tubo de centrífuga FALCON (Becton-Dicknson, Franklin Lakes, NJ, USA) y se mezcló mediante vortex hasta tener una solución homogénea. Esta solución debe ser esterilizada mediante filtración con filtros de 2µm dentro de una cámara de flujo laminar. El envase debe estar envuelto en papel aluminio para evitar el contacto con la luz. Posteriormente, esta solución se mantiene a 4°C y debe ser etiquetada con el nombre del responsable, la concentración y fecha de elaboración.

- **Sobrenadante:** Para la preparación de esta solución, se colocó los siguientes cantidades dependiendo del volumen que se vaya a preparar:

Reactivo	500 ml	200 ml	100 ml
NaCl 0,9%	4,50 gr	1,80 gr	0,90 gr
Gentamicina (50mg/ml)	1,50 ml	600 ul	300 ul
5-fluorocytosina (10mg/ml)	7,50 ml	3 ml	1,50 ml

- Dentro de una cámara de flujo laminar, la solución debe ser filtrada usando filtros de 2µm, alicuotada en tubos de centrífuga de 50ml y sellada con parafilm. Esta solución se lo mantiene a 4°C y debe ser etiquetada con el nombre del responsable, la concentración, fecha de elaboración.

- **Agar sangre:** se colocaro las siguientes cantidades de reactivo dependiendo del volumen a preparar:

<b>Reactivo</b>	<b>100 ml</b>	<b>200 ml</b>	<b>500 ml</b>
1,4 % Blood agar base	1,40 gr	2,80 gr	7,00 gr
0,5% Trypticase peptona (17,5%)	2,85 ml	5,71 ml	14,25 ml
0,5% agar	0,50 gr	1,00 gr	2,50 gr
0,6% NaCl	0,60 gr	1,20 gr	3,00 gr

Para lograr la disolución de los reactivos se recomienda calentar por 30 segundos en un microondas y agitar. Repetir el proceso si es necesario, hasta obtener una solución uniforme. Posteriormente se autoclava la solución por 45 min a 121°C. Se deja enfriar y se puede mantener a temperatura ambiente hasta su uso.

Para la preparación de los medios de cultivo se debe disolver el agar (por 1 minuto en un microondas) y mantener a 55°C, en baño maría, para evitar su polimerización.

- **Sangre defibrinada:** Para la obtención de sangre desfibrinada de conejo, se sacrificó el conejo en una cámara de CO<sub>2</sub>, siguiendo los protocolos de IAUCC (Institucional Animal Care and Use Committee) de la Universidad de Ohio, USA. Por medio de una punción cardiaca utilizando una jeringuilla de 20ml (NIPRO, Kita-ku, Osaka, Japón), se obtuvo de 20 a 50ml de cada conejo, en un ambiente estéril, la sangre fue depositada en matraces con perlas de embullición, previamente autoclavados, y se mantuvo en agitación hasta que las perlas atraparon toda la fibrina, lo cual se evidencia por la formación de un coágulo. Después, en ambiente estéril, usando una pipeta serológica estéril de 5ml o 10ml (Axygen, Union City, CA, USA), se separó la sangre del coágulo en un frasco estéril, al cual se lo etiquetó como sangre desfibrinada, con la fecha, inicial del personal responsable y se almacenó a 4°C máximo por tres días.

**b) Preparación de los tubos de cultivo:** Esta preparación se realiza en un ambiente estéril. A cada tubo de cultivo (NUNC, Roskilde, Dinamarca) se le añade 5ml de

sangre defibrinada, 150  $\mu$ l de gentamicina (50mg/ml) y 750 $\mu$ l de 5-fluorocitosina (10mg/ml) y 45 ml de agar sangre. Se mezcla suavemente con leves inversiones del tubo y se coloca un ml de esta preparación en cada tubo. Los tubos deben ser colocados en una inclinación de aproximadamente 40° hasta su polimerización. Posteriormente se añade un ml de solución sobrenadante y se tapa los tubos con tapas de caucho. Finalmente se sella las tapas con parafilm y se mantiene los cultivos a 4°C, hasta su uso, por un tiempo máximo de 3 meses.

### **Anexo 3. Preparación de medio de cultivo agar sangre para clonación de cultivos de *Trypanosoma cruzi***

Para la preparación del medio de cultivo agar sangre para la clonación, primero se preparó las siguientes soluciones:

**a) Preparación de los reactivos:**

- **Tripticasa peptona:** (ver preparación en anexo 2)

- **5-fluorocitosina:** (ver preparación en anexo 2)

- **Agar sangre:** (ver preparación en anexo 2)

- **LMP (low melting point):** Para preparar la solución con agarosa LMP, se debe preparar una solución de NaCl al 0,9% y agregar la agarosa al 3%, se disolvió y se autoclavó. Se la mantiene a temperatura ambiente hasta su uso, pero cuando se va a realizar la clonación, se la disolvió y se mantuvo a 40°C para evitar que se polimerice.

**b) Preparación de las placas:**

En una cámara de flujo laminar, se colocó en frascos autoclavados 10ml de sangre desfibrinada, 300µl de gentamicina (50mg/ml), 1,5ml de 5-fluorocitosina (10mg/ml) y 90 ml de agar sangre (a 55°C). Se mezcla la solución con suaves movimientos y se coloca 10ml en cada placa petri. Se esperó alrededor de 15 minutos para que el agar se polimerice y se selló los filos con parafilm para evitar la pérdida de humedad. Estos cultivos se almacenaron a 4°C, hasta su uso, por un tiempo máximo de 3 meses.

#### **Anexo 4. Procedimiento para el conteo de parásitos en la cámara de Neubauer**

El conteo de células es un proceso utilizado en diferentes actividades de laboratorio, como es el caso de conteo de parásitos o células sanguíneas, para lo cual se utiliza la cámara de Neubauer o hemocitómetro en el microscopio. La cámara de Neubauer o hemocitómetro está formada por un portaobjetos (Figura A4.1) y un cubreobjetos. En el primero se encuentra la ranura de carga, que es el lugar donde se coloca el cultivo o preparación a contar (Figura A4.1a), luego se encuentra la zona para derrame, que es una zona que está debajo de la cámara de conteo y que sirve para evacuar el exceso de cultivo colocado (Figura A4.1b). En esta última se encuentra la zona cuadrículada que nos va a permitir contar (Figura A4.1c).

Para el conteo de parásitos para la clonación de aislados de *Trypanosoma cruzi*, se colocó 10µl del cultivo stock en la ranura de carga del hemocitómetro (Figura A4.1) y se procedió a contar los parásitos que se encuentran en la cámara de conteo, específicamente en los cuadrados designados del uno al cinco (Figura A4.2). Si durante el conteo se sobrepasa de los 300 parásitos, se procedió a realizar diluciones (1:2, 1:4, 1:8) del cultivo stock, y se repitió el proceso de conteo.

Posteriormente, el cálculo se realiza para obtener el volumen en el que se tenga una concentración de  $1 \times 10^4$  parásitos/µl. Este cálculo se realizó mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Total células/ } \mu\text{l} = (\text{total de células contadas}/5) * (1/\text{dilución})$$

Con esta fórmula se obtiene el número total de células en cada µl. En base a este valor se realizó el cálculo para conocer el volumen necesario para obtener la concentración esperada ( $1 \times 10^4$  parásitos/µl) en base a la siguiente fórmula (Burlison *et al.*, 1992):

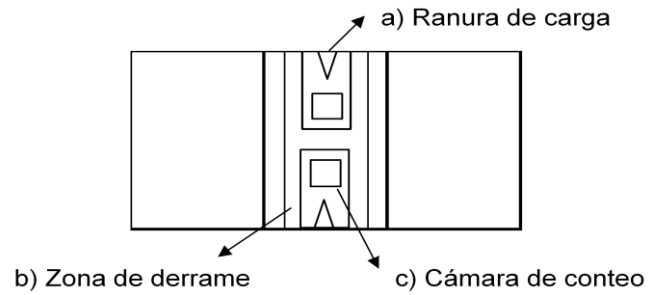
$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Donde,  $V_1$  = es volumen final deseado

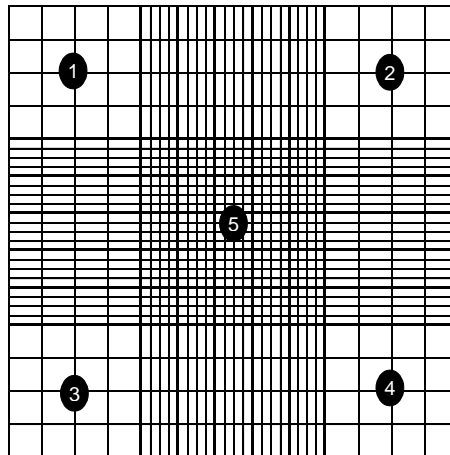
$C_1$  = es la concentración final deseada

$V_2$  = volumen que se pone de la solución original

$C_2$  = concentración de la solución original



**Figura A4.1. Estructura del hemocitómetro**



**Figura A4.2. Diseño de la cuadrícula de la cámara de conteo del hemocitómetro. Se señalan las cuadrículas seleccionadas para realizar los conteos de parásitos**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Alejandra Patricia Zurita Lagos, C.I. 1710657733, autor del trabajo de graduación intitulado “Análisis de la dinámica de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en las provincias de Manabí y Loja mediante la caracterización de subtipos de *Trypanosoma cruzi*” previa la obtención del grado académico de **LICENCIADO/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 24 de junio del 2011

Alejandra Patricia Zurita Lagos

C.I.1710657733



