

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CEPAS
DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS DE HUMANO Y VECTOR POR MEDIO
DE ITS - RFLP Y RAPD EN EL DEPARTAMENTO
DE SANTANDER (COLOMBIA).**

CLAUDIA LORENA JARAMILLO LONDOÑO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2004

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CEPAS
DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS DE HUMANO Y VECTOR POR MEDIO
DE ITS - RFLP Y RAPD EN EL DEPARTAMENTO
DE SANTANDER (COLOMBIA).**

Proyecto de grado presentado por:

CLAUDIA LORENA JARAMILLO LONDOÑO

Para optar al título de Bióloga

JORGE HERNANDEZ TORRES, Ph.D

Director

VICTOR MANUEL ANGULO, Msc.

Codirector

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2004

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Rocío y Asdrúbal.

A mi hermana Ángela María.

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP - UIS)** por el apoyo financiero, logístico y humano para la realización de este proyecto.

Al **Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT)** de la Universidad del Tolima, por facilitar sus instalaciones y brindar su asesoría para la realización de los RAPD.

Al **Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN)** por su constante colaboración.

A mi director el **Dr. Jorge Hernández Torres** por su paciencia y valiosa asesoría.

A **Lucio Navarro** por su amistad y por toda la colaboración en la fotodocumentación de los geles.

A **Genis Andrés Castillo** y **Jesús Eduardo Ortega** por estos años de gran amistad y apoyo.

A **Katherine Luna** por su amistad, sus consejos y por contribuir para hacer posible la realización de este proyecto.

Al profesor **Daniel Rafael Miranda** por las observaciones realizadas a este trabajo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta investigación.

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Cepas utilizadas en los análisis.	19
Tabla 2. <i>Primers</i> empleados en la amplificación de los ITS.	21
Tabla 3. Estandarización del <i>master mix</i> para la ITS - PCR.	22
Tabla 4. Estandarización rutina de amplificación (<i>Touchdown</i> PCR) para la ITS - PCR.	22
Tabla 5. Rutina de amplificación para la RAPD - PCR.	24
Tabla 6. Cuantificación por el método <i>dot - spot</i> del ADN de los aislados.	26
Tabla 7. Mezcla de reacción estandarizada para la ITS - PCR.	27
Tabla 8. Rutina de amplificación para la ITS - PCR.	28

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Tripomastigote de <i>T. cruzi</i> en un extendido de sangre periférica.	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	5
Figura 3. Distribución de la enfermedad de Chagas.	6
Figura 4. Vectores de la enfermedad de Chagas.	7
Figura 5. Signo de Romana.	10
Figura 6. Cardiomegalia en la enfermedad de Chagas crónica.	11
Figura 7. Megacolon producido por destrucción de los plexos mesentéricos.	12
Figura 8. Organización del ADN ribosomal en tripanosomátidos.	15
Figura 9. Esquema del Modelo Histotrópico Clonal de la enfermedad de Chagas.	17
Figura 10. Caracterización de aislados de humano y vector con los iniciadores TC, TC1 y TCC.	25
Figura 11. Amplificación de los ITS de las cepas seleccionadas y dos aislados de referencia.	27
Figura 12. Perfiles de restricción con las enzimas HaeIII y Taq I.	30
Figura 13. Perfiles de restricción con las enzimas BstU I y Rsa I.	31
Figura 14. Dendrograma generado con NTSYS, a partir de los datos de ITS - RFLP.	32
Figura 15. Dendrograma generado con FreeTree, a partir de los datos de ITS - RFLP.	34
Figura 16. Patrones de RAPD con el primer OPBG-16.	36
Figura 17. Patrones de RAPD con el primer OPBG-17.	37
Figura 18. Dendrograma generado con NTSYS, a partir de los datos de RAPD con los <i>primers</i> OPBG-16 y OPBG-17.	38
Figura 19. Dendrograma generado con <i>FreeTree</i> , a partir de los perfiles de RAPD con los <i>primers</i> OPBG 16 y OPBG-17.	40

LISTA DE ANEXOS

	pag.
Anexo A. Medio líquido para cultivo de tripanosomátidos <i>liver infusion tryptose</i> (LIT).	67
Anexo B. Medio líquido para cultivo de tripanosomátidos REI modificado.	68
Anexo C. Extracción por el método fenol - cloroformo.	69
Anexo D. Cuantificación del ADN con el método <i>dot spot</i> .	70
Anexo E. Visualización de productos de amplificación sobre geles de poliacrilamida.	71
Anexo F. Matriz de presencia - ausencia derivada de los perfiles de ITS - RFLP.	73
Anexo G. Matriz de similaridad generada con el coeficiente de Jaccard, a partir de los datos de ITS - RFLP (NTSYS).	77
Anexo H. Matriz de presencia - ausencia derivada de los perfiles de RAPD.	78
Anexo I. Matriz de similaridad generada con el coeficiente de Jaccard a partir de los datos de RAPD (NTSYS).	82
Anexo J. Dendrograma generado con FreeTree, a partir de los perfiles de RAPD eliminando la banda Rsa18.	83

CONTENIDO

	pag.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 CONSIDERACIONES GENERALES	3
1.2 CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	5
1.3.1 Vectores.	6
1.3.2 Reservorios.	7
1.3.3 Mecanismos de transmisión.	7
1.3.3.1 Vectorial.	7
1.3.3.2 Transfusional.	8
1.3.3.3 Congénito.	8
1.3.3.4 Otras formas de transmisión.	8
1.4 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	9
1.4.1 Fases y formas clínicas.	9

1.4.1.1 Fase aguda.	9
1.4.1.2 Forma indeterminada.	10
1.4.1.3 Fase crónica.	10
1.4.1.4 Forma cardíaca.	10
1.4.1.5 Forma digestiva.	10
1.4.1.6 Forma nerviosa.	11
1.5 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	11
1.6 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.7 ESTRUCTURA CLONAL DE <i>T. cruzi</i>	15
1.8 VARIABILIDAD DE LAS CEPAS COLOMBIANAS DE <i>T. cruzi</i>	16
2. METODOLOGÍA	19
2.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS	19
2.2 CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS	20
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>T. cruzi</i>	20
2.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN	20
2.5 PCR - RFLP DEL ESPACIADOR INTERGÉNICO TRANSCRITO (ITS) DEL ADN RIBOSOMAL DE <i>T. cruzi</i>	21

2.6 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DEL ADN POLIMÓRFICO DE <i>T. cruzi</i>	23
3. RESULTADOS	25
3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS	25
3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN	25
3.3 PCR - RFLP DE LOS ESPACIADORES INTERGÉNICOS TRANSCRITOS DE <i>T. cruzi</i>	26
3.3.1 Amplificaciones y digestión con enzimas de restricción.	26
3.3.2 Análisis fenético.	29
3.3.3 <i>Bootstrapping</i> .	33
3.4 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DEL ADN POLIMÓRFICO (RAPD) DE <i>T. cruzi</i>	35
3.4.1 Análisis fenético.	38
3.4.2 <i>Bootstrapping</i> .	39
4. DISCUSIÓN	41
5. CONCLUSIONES	48
6. RECOMENDACIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	67

RESUMEN

TITULO

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS DE HUMANO Y VECTOR POR MEDIO DE ITS - RFLP Y RAPD EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER (COLOMBIA).*

AUTOR

CLAUDIA LORENA JARAMILLO LONDOÑO.**

PALABRAS CLAVES

Trypanosoma cruzi, *internal transcribed spacer* (ITS), *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD).

DESCRIPCIÓN O CONTENIDO

La Enfermedad de Chagas es una zoonosis ampliamente distribuida en el continente americano, donde alrededor de 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas y 100 millones en riesgo de contraer la infección. Es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitido a los humanos por insectos hemípteros de la subfamilia Triatominae. Recientes trabajos indican que puede presentarse una selección de clones de *T. cruzi* a medida que la cepa transita por los diferentes hospederos. Con objeto de evaluar si existe polimorfismo genético entre cepas de *T. cruzi* aisladas de vectores y humanos, se caracterizaron ocho aislados de vector, ocho de humano y dos cepas de referencia con las técnicas de ITS – RFLP y RAPD. Se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el coeficiente de Jaccard para generar las matrices de similaridad y UPGMA para la construcción de los dendrogramas. Los resultados del análisis de agrupamiento muestran una segregación entre los aislados de vector y los de humano, indicando que existen diferencias entre estos dos grupos. Sin embargo, tres aislados de vector parecen guardar mayor similaridad con los aislados de humano, agrupándose en *clusters* separados. Se concluye que existen diferencias genéticas entre las cepas de *T. cruzi* aisladas de vectores y humanos, aunque algunos aislados de vector podrían encontrarse en un proceso de homogenización dentro del ciclo doméstico de transmisión. Se resalta la importancia de la caracterización de las cepas de *T. cruzi* colombianas, que contribuya a un mejor entendimiento de las características epidemiológicas regionales de la enfermedad de Chagas.

* Tesis.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Dirección: Dr. Jorge Hernández Torres. Codirección: Dr. Víctor Manuel Angulo.

ABSTRACT

TITLE

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS DE HUMANO Y VECTOR POR MEDIO DE ITS - RFLP Y RAPD EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER (COLOMBIA).*

AUTHOR

CLAUDIA LORENA JARAMILLO LONDOÑO. **

KEYWORDS

Trypanosoma cruzi, internal transcribed spacer (ITS), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).

DESCRIPTION OR COTENT

Chagas disease is a zoonosis widely distributed in the American continent, where about 16 to 18 million people are infected and 100 millions in risk to contracting the infection. It is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, and transmitted to the human by triatominae vectors. Recent works indicate that a clones' selection of *T. cruzi* isolates can be produced as a result of the stock transit along the different hosts. In order to evaluate if genetic polymorphism between vector and human stocks of *T. cruzi* exists, sixteen isolates from both hosts and two reference stocks was characterized by ITS - RFLP and RAPD techniques. Cluster analysis was carried out using Jaccard's coefficient to generate similarity matrix and UPGMA for the construction of the phenograms. The cluster analysis results evidence segregation between vector and human isolates, indicating differences between these two groups. However, three vector isolates are more similar to human ones, clustering separately. Genetic polymorphism between the *T. cruzi* stocks isolated from vectors and human included in this work was concluded, although some vector isolates more similar to human stock, would be part of a homogenization process, within domestic transmission cycle. Was highlighted the importance of colombian *T. cruzi* stocks characterization, in order to contribute with a better understanding of the epidemiologic regional characteristics of Chagas disease.

* Tesis.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Dirección: Dr. Jorge Hernández Torres.
Codirección: Dr. Víctor Manuel Angulo

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana constituye un grave problema de salud pública en Latinoamérica, donde 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas y 100 millones en riesgo de contraer la infección (OMS, 1991). Es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida a los humanos por insectos hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Corredor et al., (1993), señalan al departamento de Santander como una de las zonas del país más afectada por la enfermedad de Chagas. Más recientemente, el Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil, del Ministerio de Salud lo confirman (Angulo et al., 1999a). En este Departamento se han realizado diversos trabajos con el objeto de conocer aspectos sobre distribución de vectores, áreas de riesgo y prevalencia de la infección (Angulo et al., 1997, 1998, 1999a y b). Sin embargo, son pocos los trabajos que emplean técnicas moleculares para caracterizar las subpoblaciones de *T. cruzi* que circulan en los diferentes ciclos de transmisión (Devia et al., 1999).

Las poblaciones de *T. cruzi* exhiben una amplia variabilidad genética (Devera et al., 2003; Macedo et al., 2004), atribuida a su modo de propagación básicamente clonal (Tibayrenc et al., 1990 y 1991), en el cual cada clon presenta características genéticas y biológicas particulares (Andrade L.O., 1999). Los clones abundantes son llamados clones principales (Tibayrenc & Brenière, 1998), pudiendo encontrarse circulando en determinadas regiones geográficas y ciclos de transmisión (Solari et al., 1992; Bosseno et al., 1996; Campos et al., 1999; Brenière et al., 1998)

Algunos estudios sugieren que está presentándose una posible selección de clones entre vectores y humanos, revelada por diferencias en la distribución de los clones que infectan a ambos hospederos (Brenière et al., 1998; Macedo & Pena, 1998; Macedo et al., 2002). Este comportamiento tiene implicaciones clínicas y epidemiológicas importantes, pues podría indicar que entidades genéticamente divergentes circulando en determinadas áreas

endémicas, son responsables por las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes de dichas áreas (Andrade S.G., 1999).

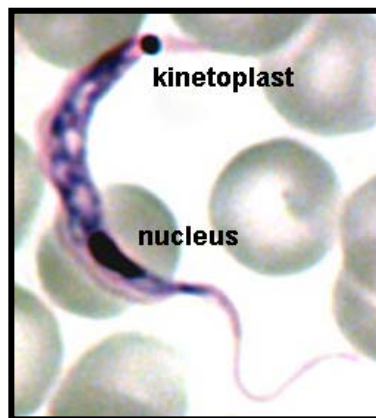
El presente trabajo hace parte de la línea en epidemiología molecular que se ha implementado el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP - UIS). Hace parte de un proyecto macro de caracterización de las cepas de *Trypanosoma cruzi*, que busca establecer los diferentes aspectos de la epidemiología de la Enfermedad de Chagas a nivel regional. Estas investigaciones, contribuirán a sentar las bases para la aplicación de futuros programas de prevención y control.

1. ANTECEDENTES

1.1 CONSIDERACIONES GENERALES

La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y transmitida a los humanos por insectos hemípteros de la familia Reduviidae y de la subfamilia Triatominae (Figura 1). Fue descubierta en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, mientras adelantaba investigaciones sobre paludismo en el intestino de un hemíptero, *Pastrongylus megistus*. Posteriormente, encontró el mismo parásito en un mono y un niño que presentaba linfadenopatía y fiebre. Lo denominó *Schizotrypanum cruzi*, creyendo que se dividía por esquizogonia. El mismo reconoció su error y lo renombró *Trypanosoma cruzi* (Beaver et al., 1986).

Figura 1. Tripomastigote de *T. cruzi* en un extendido de sangre periférica.



Fuente: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>

Desde la descripción de la patología por el Dr. Chagas, se empezaron a implementar estrategias orientadas a la interrupción de la infección. Sin embargo, se calcula que existen en Latinoamérica alrededor de 18 millones de personas infectadas y aunque los programas de control vectorial han hecho declinar el número de infecciones, todavía existe un cuarto de la población latinoamericana en áreas de riesgo (OMS, 1991). El impacto

social de la Enfermedad de Chagas es alto, calculándose una pérdida anual de 752.000 vidas productivas debido a las muertes prematuras. La pérdida económica que esto representa equivale al 5% de la deuda externa de todo el continente en 1995 (Moncayo, 1999 y 2003).

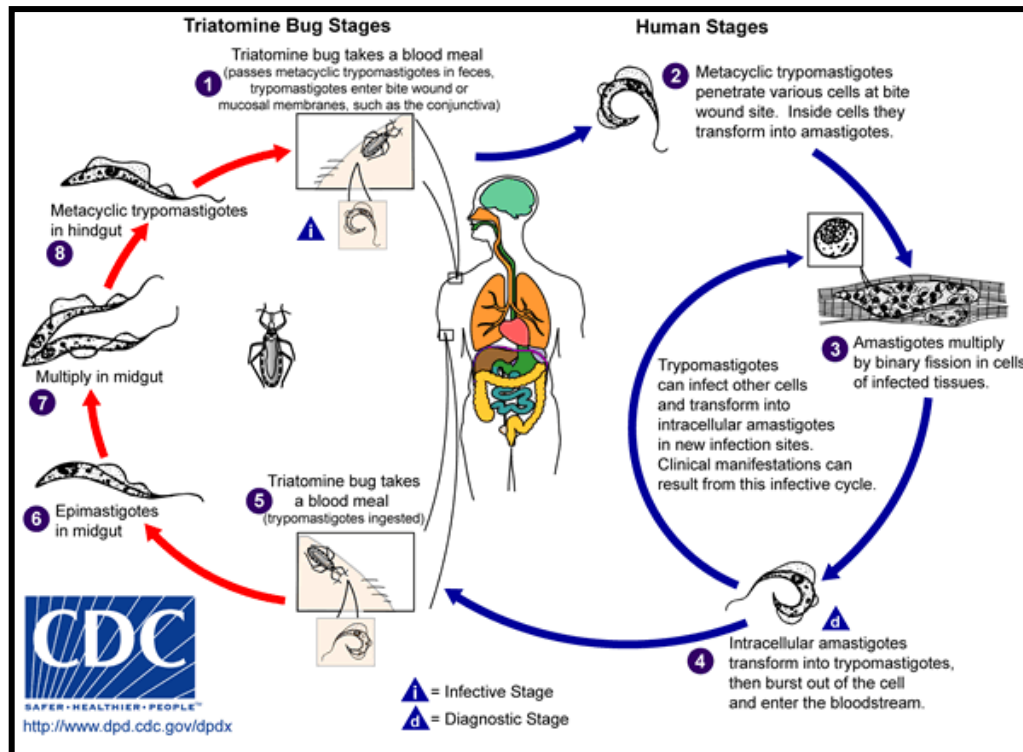
1.2 CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi pertenece al orden Kinetoplastidae, familia Trypanosomatidae y se caracteriza por la existencia de un único flagelo y un kinetoplasto, organelo que contiene cerca del 25% de todo el ácido desoxirribonucleico (ADN). Este material está constituido por estructuras circulares de dos tamaños; maxi - círculos y mini - círculos que están dispuestos concatenadamente (Romanha, 1992). El ciclo de vida involucra tres estadios, identificados morfológicamente por la posición del kinetoplasto en relación con el núcleo y la aparición del flagelo. En la forma tripomastigote (infectante), el kinetoplasto se sitúa posterior al núcleo en posición terminal o sub-terminal; en el epimastigote (encontrado en el vector o en el medio de cultivo), el kinetoplasto está en posición anterior o próximo al núcleo de la célula. Finalmente, los amastigotes (que se encuentran y multiplican dentro de las células), son formas esféricas con flagelo incipiente que no es visible al microscopio óptico (Souza, 2000).

El ciclo de vida de *T. cruzi* transcurre entre los reservorios mamíferos, vectores y humanos (Figura 2). La primera transformación del parásito ocurre en el estómago del vector, el cual se infecta al ingerir los tripomastigotes circulantes en la sangre de los infectados; estos se convierten en epimastigotes pocas horas después. La segunda diferenciación ocurre en el tubo digestivo de los insectos cuando los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes para el hospedero vertebrado). Esta diferenciación suele presentarse hacia el final del intestino en el recto (García & Azambuja, 2000).

La infección humana se produce a través de las heces de los insectos en las que se encuentran los tripomastigotes metacíclicos. Al picar a los humanos defecan sobre la piel, depositando los tripomastigotes infectivos, que penetran a través de la picadura u otro punto lesionado, o por las mucosas. (Botero & Restrepo, 1998).

Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*.



Fuente: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.asp?body=S-Z/TrypanosomiasisAmerican/body_TrypanosomiasisAmerican_il3.htm.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

T. cruzi puede ser detectado sobre una amplia zona de América, desde la latitud 42 N a la 46 S. La distribución de los vectores y reservorios silvestres es mucho mayor que la enfermedad humana. La domiciliación de los triatóminos expone al menos a 90 millones de personas a contraer la infección, desde el sur de los Estados Unidos a la provincia de Chubut, en Argentina (Figura 3). La Enfermedad de Chagas es un problema

estrechamente relacionado con las condiciones de vida precarias de la población que habita las zonas rurales (OMS, 1991).

Figura 3. Distribución de la enfermedad de Chagas.

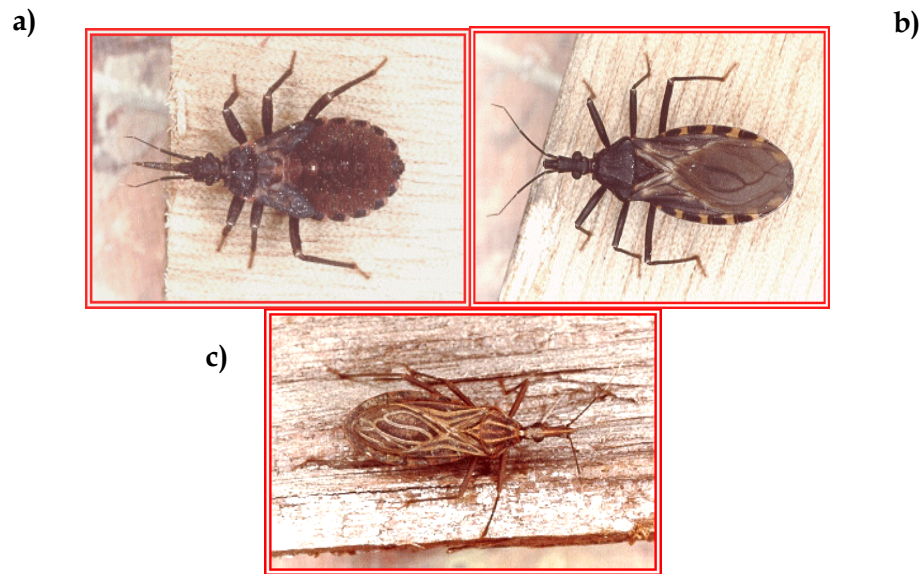


Fuente: <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>

1.3.1 Vectores. Existen más de 120 especies de triatominos (comúnmente llamados “pitos” en Colombia), familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y más de 50 transmiten a *T. cruzi*; pero solo algunas son vectores principales, que generalmente colonizan las casas (Lent & Wygodzinsky, 1979). En general, todos los triatominos son susceptibles a la infección por *T. cruzi* en cualquiera de sus estadios evolutivos; no obstante, la mayoría de ellos se relacionan con especies animales refractarias a la infección con este parásito (Dias, 2000a).

Se destacan por su importancia epidemiológica: *Triatoma infestans*, en los países del cono Sur y Perú; *Rhodnius prolixus*, en el norte de América del Sur y América Central; *Panstrongylus megistus*, en el oriente y centro de Brasil; *Triatoma brasiliensis*, en el noreste del Brasil y *Triatoma dimidiata*, en América Central y las regiones bajas de Perú y Ecuador (Linhares, 2000) (Figura 4).

Figura 4. Vectores de la enfermedad de Chagas. a) *Pastrongylus megistus*; b) *Triatoma dimidiata*; c) *Rhodnius prolixus*.



Fuente: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/triatoma.html>

1.3.2 Reservorios. Diversos mamíferos son reservorios de *T. cruzi*, tanto salvajes como domésticos, tales como armadillos, zarigüeyas, ratas de campo, mapaches, hormigueros, ardillas, monos, etc. Así mismo, en algunos países de América del Sur, animales domésticos tales como perros y gatos pueden actuar como reservorios (Beaver et. al., 1986).

1.3.3 Mecanismos de transmisión.

1.3.3.1 Vectorial. El mecanismo más importante de transmisión de *T. cruzi* para los humanos y otros mamíferos es a través de las heces de los triatominos. Estas especies colonizan las viviendas rurales, donde es posible encontrar cientos de individuos. Otras especies habitan estrictamente diferentes ecotopos silvestres y nunca invaden las casas, por lo cual no representan ningún peligro para el hombre. Las principales especies domiciliadas son responsables de más del 80% de los casos de Enfermedad de Chagas en áreas endémicas. La transmisión vectorial de *T. cruzi* al hombre y otros mamíferos se debe al contacto con las heces del vector infectado, que contienen los tripomastigotes metacíclicos infectivos (Dias, 1992).

El vector también tiene gran impacto en el flujo de clones de parásitos en los ciclos de transmisión, actuando como filtros biológicos, por lo cual los vectores juegan un papel determinante en la epidemiología regional de la entidad. Por ejemplo, *Rhodnius prolixus*, se ha relacionado con *T. cruzi* I principalmente (OMS, 1991; Fernandes, 1998 y 1999b).

1.3.3.2 Transfusional. La segunda forma de transmisión es la transfusional por su potencialidad de ocurrencia en zonas urbanas, donde se sitúa el 70% de la población del continente. La migración humana desde áreas endémicas a las ciudades aumenta el riesgo de transmisión (OMS, 1991). En Colombia, la tasa de infección en donantes oscila entre 0 y 12.6% con una tasa global de 1.16% (Behrend et al., 2002).

1.3.3.3 Congénito. La infección prenatal es posible por pasaje transplacentar de trypanosomas de la madre con infección crónica o aguda. Se ha determinado que el riesgo de infección congénita se encuentra entre 0.5 y 6%, variando regionalmente y siempre involucrando alteraciones placentarias (Dias, 2000b).

1.3.3.4 Otras formas de transmisión. En la *lactancia* la posibilidad de infección del hijo por leche materna contaminada, ha sido verificada clínicamente y cuenta con evidencia experimental. Sin embargo, su ocurrencia es excepcional y muchos especialistas consideran que es un riesgo remoto (Bittencourt, 2000). La transmisión por *transplante de órganos* fue reportada desde los años 60, especialmente por trasplantes de riñón (la mayoría), corazón y páncreas. También es posible la contaminación accidental en el *laboratorio*, durante la manipulación de triatominos, animales infectados o material biológico de personas enfermas. Finalmente, la *transmisión oral* es posible, debido a la ingesta de alimentos contaminados con heces de triatominos (Dias, 2000b).

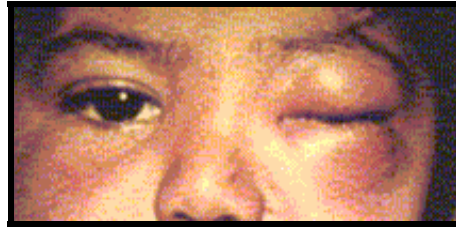
1.4 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

T. cruzi invade principalmente las células del sistema retículo - endotelial del bazo, hígado, ganglios linfáticos y del miocardio. También puede infectar los músculos estriado y liso del sistema digestivo, la médula ósea, glándulas suprarrenales, sistema nervioso central y los histiocitos de la piel y el tejido subcutáneo. La lesión primaria, localizada en la región de inoculación del parásito se denomina chagoma. Se debe a un proceso inflamatorio con infiltración tisular de histiocitos y polimorfonucleares y la obstrucción de la circulación linfática de la zona (Morales, 1993).

1.4.1 Fases y formas clínicas. Las dos fases de la enfermedad de Chagas son: Fase aguda, de corta duración y una fase crónica que permanece para toda la vida. La enfermedad puede ser mortal en ambos casos.

1.4.1.1 Fase aguda. La infección chagásica se inicia con un conjunto de manifestaciones variables en frecuencia e intensidad, caracterizadas por la señal de puerta de entrada del parásito. Esta lesión recibe el nombre de “chagoma” y consiste en una zona endurecida eritematosa con inflamación e hipertrofia de los ganglios regionales. Cuando la vía de entrada del parásito es la mucosa conjuntival, aparece un edema indoloro unilateral en las párpados o en los tejidos adyacentes denominado “signo de Romana” (Figura 5). Las manifestaciones clínicas más frecuentes comprenden fiebre, edema, hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiencia cardíaca. La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, con apenas 1 a 2% de los pacientes con síntomas una o dos semanas después de la infección (Rassi et al., 2000). La fase aguda ocurre generalmente en niños. Entre el 5 y el 10% de los pacientes sintomáticos mueren durante esta fase, debido a la encefalomiелitis o la falla cardíaca severa (Prata, 2001).

Figura 5. Signo de Romaña.



Fuente: <http://www.tabaquismo.freehosting.net/EPIDEMIOLOGIA/ANALOGIAENDEMIAS.htm>.

1.4.1.2 Forma indeterminada. Entre cuatro a diez semanas después de contraer la infección, los síntomas iniciales desaparecen y comienza la forma indeterminada de la fase crónica. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y puede perdurar a lo largo de 10 a 30 años (Macêdo, 1999; Prata, 2001). Esta forma se presenta entre el 60 y el 70% de los pacientes crónicos. Entre 2 y 5% de los pacientes en la fase indeterminada, desarrollan una forma cardíaca o digestiva cada año (Umezawa et al., 2000).

1.4.1.3 Fase crónica. Después de varios años de latencia (período asintomático conocido como forma indeterminada), el 25% de los individuos infectados pueden desarrollar síntomas cardíacos (forma cardíaca), 6% daños digestivos (forma digestiva), y el 3% compromiso del sistema nervioso periférico (forma nerviosa) (Moncayo, 2003).

1.4.1.4 Forma cardíaca. La fase cardíaca crónica de la Enfermedad de Chagas está caracterizada por miocarditis progresiva y falla cardíaca congestiva, asociada a hipertrofia miocárdica, degeneración miocítica, fibrosis intersticial severa y el adelgazamiento de las membranas de soporte. Las causas fundamentales de mortalidad en pacientes con cardiopatía chagásica crónica son la muerte súbita, la insuficiencia cardíaca y en menor grado las embolias (Lázzari, 1999) (Figura 6).

1.4.1.5 Forma digestiva. En un área endémica, entre 15 y 20% de los pacientes desarrollan alteraciones de la motilidad, secreción y absorción en el tracto digestivo, especialmente en el esófago y el colon. Los síntomas y señales de compromiso esofágico son: disfagia, regurgitación, epigastralgia, dolor al deglutir, hipersalivación, regurgitación, constipación,

hipertrofia de las glándulas salivares y desnutrición. El megacolon se presenta con constipación intestinal, meteorismo, distensión abdominal y fecaloma (Rezende & Moreira, 2000). En países del norte como Ecuador, Venezuela, Colombia y en América Central, estas manifestaciones son raras (Rezende & Luquetti, 1994) (Figura 7).

Figura 6. Cardiomegalia en la enfermedad de Chagas crónica.



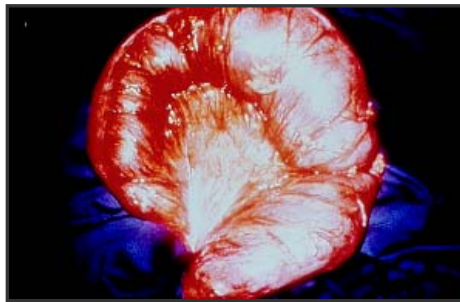
Fuente: <http://www.health.gov.mt/impaedcard/issue/issue5/2839/2839.htm#Chaga's%20disease>.

1.4.1.6 Forma nerviosa. En estos casos, los individuos manifiestan signos neurológicos y déficit mental, debido principalmente a secuelas de la fase aguda. Esta forma se encuentra con mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos, en individuos sometidos a transplantes de órganos o infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se evidencia así, la importancia el estado inmunológico para la resistencia a esta forma de la enfermedad (Ferreira et al., 1991; Rocha et al., 1994).

1.5 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

No existe ninguna droga que asure la curación de la Enfermedad de Chagas en pacientes crónicos o agudos. El tratamiento se realiza con Nifurtimox o Benznidazole, los cuales producen severos efectos secundarios, por lo que requieren medicación de soporte. Además, se ha comprobado la aparición de resistencia a estos medicamentos en los parásitos (Dusanic, 1991; Kirchhoff et al., 2000; Rivarola et al., 2001).

Figura 7. Megacolon producido por destrucción de los plexos mesentéricos.



Fuente: Umezawa et al., (2001).

1.6 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE *Trypanosoma cruzi*

Desde la década de los 70's se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios con el objeto de comprender las características epidemiológicas de *T. cruzi*. Inicialmente, estos se basaron en el análisis de patrones electroforéticos de isoenzimas, con el objeto de evaluar la diversidad y genética poblacional del parásito. Los trabajos de Ready & Miles (1979) permitieron la clasificación de *T. cruzi* en tres grupos principales conocidos como Zimodemas: Z1, Z2 y Z3. El Zimodema Z1 está asociado con el ciclo doméstico en los países del Norte de Suramérica como Venezuela y Colombia. En el oriente y centro de Brasil, el Zimodema predominante dentro del ciclo domiciliado es Z2, encontrándose a Z1 y Z3 en el ciclo selvático. Una década después, estudios posteriores empleando 15 *loci* adicionales, mostraron una diversidad genética mucho mayor, encontrándose 43 genotipos distintos (Tibayrenc et al., 1986, 1988).

Desde entonces, numerosas técnicas han sido empleadas para evaluar la variabilidad de *T. cruzi*: Polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN del kinetoplasto (esquizodemos); *DNA fingerprinting*, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *Sequence Repeat Anchored Primer* (SSR - PCR), cariotipo, polimorfismos del ADN ribosomal, genes de mini-exon y *Low Stringency Single Specific Primer* (LSSP-PCR) (Macedo & Pena, 1998; Macedo et al., 2002). Entre estas técnicas, el análisis de los genes de mini-exon ha permitido dividir a *T. cruzi* en dos grupos principales denominados linajes (Souto et al.,

1996), los cuales coinciden con los zimodemos de Miles. El zimodemo Z2 corresponde al linaje 1, mientras las cepas clasificadas como Z1 concuerdan con el linaje 2. Z3 corresponde a un sub - linaje dentro del linaje 2 (Zingales et al., 1999).

La nomenclatura de *T. cruzi* fue unificada durante la reunión de Río de Janeiro en 1999 *International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas, (Recommendations from a satellite meeting 1999)*:

- a) *T. cruzi* I equivalente a Zimodema 1 (Miles et al., 1977, 1978; Barrett et al., 1980); Tipo III (Andrade, 1974); Linaje 2 (Souto et al., 1996); Grupo 1 (Tibayrenc, 1995); Ribodema II/III (Clark &Pung, 1994) o similar.
- b) *T. cruzi* II equivalente a Zimodema 2 (Miles et al., 1977, 1978; Barrett et al., 1980); Zimodema A (Romanha et al., 1979); Tipo II (Andrade, 1974); Linaje 1 (Souto et al., 1996); Grupo 2 o DTU 2 (Tibayrenc, 1995); Ribodema I (Clark &Pung, 1994) o similar.
- c) *T. cruzi* (sin sufijo) equivalente a las cepas que no fueron previamente caracterizadas o cuya caracterización es incierta.
- d) La designación de las cepas aparentemente híbridas como Zimodema 2b (Miles et al., 1984); Zimodema B (Romanha et al., 1979); Tipo I (Andrade, 1974); Grupo 1/2 tipificado por 24Sα rADN (Souto et al., 1996); genotipo 39 (Tibayrenc, 1995) será determinada después de futuros estudios. Una situación similar existe para las cepas equivalentes al Zimodema 3 (Miles et al., 1978, 1981).

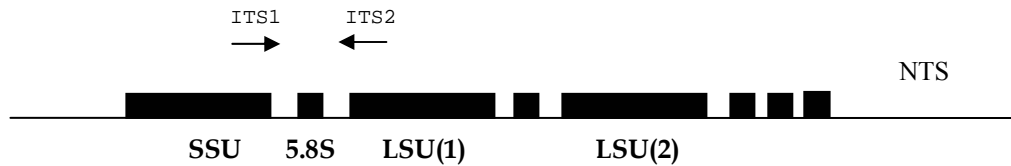
Entre las numerosas técnicas moleculares, la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (Williams et al., 1990), se ha utilizado con éxito para evaluar la variabilidad de *T. cruzi* (Tibayrenc et al., 1993 ; Steindel et al., 1993; Bastrenta et al., 1998; de Castro et al., 1999; Martínez-Díaz et al., 2001; Rodríguez et al., 2002). RAPD es una herramienta valiosa

para estudios genéticos y de biología evolutiva, pues presenta varias ventajas: *i*) no requiere un conocimiento previo de las secuencias de ADN en el organismo de interés; *ii*) permite identificar muchos marcadores a la vez; *iii*) es posible analizar una gran cantidad de individuos debido a sus costos moderados, hecho que es de importancia en estudios de genética poblacional (Tibayrenc, 1993). Una desventaja de esta técnica, es requerir un estricto control en todas las condiciones experimentales, para asegurar su reproducibilidad (Hillis et al., 1996).

Recientemente, se han desarrollado técnicas más precisas como la amplificación de los espaciadores intergénicos de los cistrones del ADN ribosomal (rADN). Estos genes son altamente conservados y muy útiles en estudios filogenéticos (Hillis et al., 1996; Cupolillo et al., 1995; Devera et al., 2003). Las regiones codificantes de las subunidades grande y pequeña de los genes ribosomales (LSU y SSU), están separadas por espaciadores intergénicos transcritos (ITS), que flanquean el gen 5.8S del rRNA (Figura 8). Los ITS contienen secuencias de gran variabilidad. Como están rodeados por genes altamente conservados, pueden diseñarse *primers* que hibridicen en estas regiones (Cupolillo et al., 1995; Fernandes et al., 1999a).

Los ITS han sido ampliamente utilizados en hongos y otros microorganismos (McCullough et al., 1998, 1999; Jackson et al., 1999; Bingdong et al., 2000; Xu et al., 2000; Lin et al., 2001). En la actualidad, están cobrando importancia como herramienta para evaluar la heterogeneidad dentro de la familia *Trypanosomatidae* (Cupolillo et al., 1995; Fernandes et al., 1999a; Tilley & Hide, 2001; Santos et al., 2002; Cuervo et al., 2002) y distinguir variaciones intraespecíficas en *T. cruzi* (Devera et al., 2003).

Figura 8. Organización del ADN ribosomal en tripanosomátidos. Las flechas indican la posición de los espaciadores intergénicos, para los cuales se diseñan los *primers* que amplifican estas regiones. LSU, subunidad larga; SSU, subunidad pequeña; ITS, espaciador intergénico transcrito; NTS, espaciador no transcrito.



Fuente: Adaptación de Cupolillo et al., (1995).

1.7 ESTRUCTURA CLONAL DE *T. cruzi*

Con base en numerosas investigaciones, Tibayrenc et al., (1990, 1991, 1993) han propuesto que *T. cruzi* presenta una estructura poblacional de tipo clonal. Cada clon es una entidad independiente que se reproduce por separado. Han subdividido a Z1, Z2 y Z3 en muchos Zimodemas de acuerdo a estudios realizados en Suramérica. El término "clonet" fue propuesto por Tibayrenc & Ayala (1991) y designa todos los aislados en una especie clonal, que parecen idénticos con un grupo determinado de marcadores. Algunos clonets parecen ampliamente distribuidos y se denominan "clones principales" (Tibayrenc & Ayala, 1988).

Debido a que *T. cruzi* está compuesto de poblaciones heterogéneas, el mismo huésped puede ser infectado simultáneamente por diferentes cepas. Esto hace evidente la existencia de clones representativos en muchos huéspedes de diferentes áreas geográficas latinoamericanas (Andrade S.G., 1999; Lauria-Pires et al., 1997). Una hipótesis sugiere que la heterogeneidad y la multiclonalidad de una cepa, determina el tropismo diferencial por tejidos y por consiguiente, las variaciones en la presentación clínica de la enfermedad (Andrade L.O. et al., 1999). Esta correlación entre patogenicidad y variabilidad genética de *T. cruzi*, fue propuesta recientemente como el *Modelo Histotrópico Clonal* (Macedo et al., 1992; Macedo & Pena, 1998; Macedo et al., 2002) (Figura 9).

Una cepa en particular está representada por un grupo de clones que forman una unidad, con características genéticas y relaciones simbióticas particulares. Sin embargo, estas relaciones entre los diferentes clones pueden cambiar según el ambiente al que sean sometidos. Esta situación puede hacerse evidente en el paso del hospedero invertebrado al humano, el cual debido a factores fisiológicos e inmunológicos, puede ejercer un efecto de selección. En tales circunstancias, algunos clones que no pueden competir bajo las nuevas condiciones del humano no sobrevivirán. De esta manera, se vería reducida la complejidad de la cepa infectante (Macedo et al., 2002) (Figura 9). Se ha demostrado que las cepas aisladas de hospederos vertebrados e invertebrados silvestres, son mucho más complejas que las aisladas de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica o aguda (Oliveira et al., 1998 y 1999).

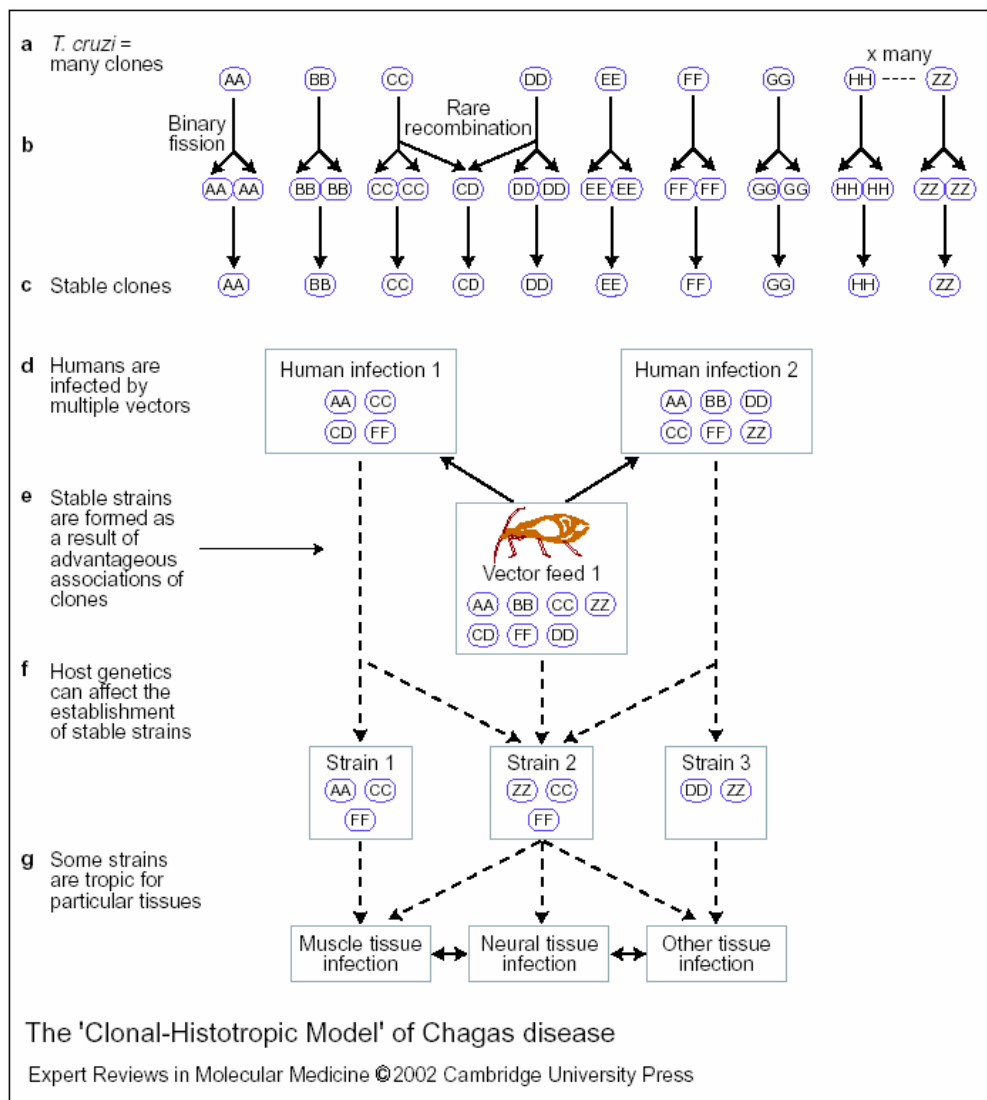
Adicionalmente, con objeto de caracterizar una cepa del parásito, es necesario aislar a *T. cruzi* por medio de inoculación en animales, xenodiagnóstico y cultivo *in vitro*. Estos procedimientos pueden facilitar la selección de sub - poblaciones específicas del parásito que estaban presentes en el inóculo original, difiriendo de la población presente en la sangre o el tejido. Además, debido al tropismo, los clones circulantes disponibles en el momento del hemocultivo, pueden diferir de aquellos que están causando la lesión. Todos estos factores, constituyen la base del mencionado modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas (Macedo &Pena, 2002; Devera et al., 2003).

1.8 VARIABILIDAD DE LAS CEPAS COLOMBIANAS DE *T. cruzi*

En Colombia se han realizado diversos trabajos empleando isoenzimas, con el fin de caracterizar las cepas locales (Widmer et al., 1985; Saravia et al., 1987; Rodríguez et al., 1998; Jaramillo et al., 1999; Ruiz-García et al., 2001; Montilla et al., 2002). Los resultados revelaron que existe una amplia variabilidad, mucho mayor que en otros países de Latinoamérica (Ruiz-García et al., 2000).

La gran mayoría de cepas colombianas aisladas de vectores, reservorios silvestres y humanos, muestran un marcado predominio de *T. cruzi* Z1, seguido por Z3 y en menor proporción *Trypanosoma rangeli* (Widmer et al., 1985; Saravia et al., 1987; Rodríguez et al., 1998; Triana et al., 1999; Montilla et al., 2002). Recientemente, Devia (1999), caracterizó 25 aislados de *T. cruzi* a partir de humanos provenientes del Departamento de Santander y regiones próximas. El 80% correspondieron a Z1 y 20% a Z3. Se encontró en este estudio un caso de infección mixta con *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Figura 9. Esquema del Modelo Histotrópico Clonal de la enfermedad de Chagas.



Fuente: Macedo &Pena (2002).

Sánchez et al., (1998) caracterizaron 31 aislados de *Didelphys marsupialis*, encontrando que todos pertenecen a *T. cruzi* I. En un estudio reciente, Cuervo et al., (2002) caracterizaron 14 cepas de diferentes reservorios y regiones de Colombia, utilizando la técnica de *PCR multiplex* descrita por Fernandes et al., (2001), que permite distinguir entre *T. cruzi* I, II, Z3 y *T. rangeli*. Se demostró que 10 aislados pertenecían a *T. cruzi* I, tres a Z3 y uno a *T. rangeli*. En este mismo trabajo las cepas fueron sometidas a ITS - RFLP, encontrándose un alta variabilidad intragrupo, resultado que podría ser atribuido a los diferentes orígenes geográficos de los aislados.

2. METODOLOGÍA

2.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS

Se analizaron ocho cepas aisladas de humano y ocho aisladas de vector, seleccionadas del banco de cepas del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP - UIS) (Tabla 1). Las cepas a estudiar, se eligieron de zonas con altas tasas de infestación con triatominos e infección por *T. cruzi*.

Se trabajó con cepas de *T. cruzi* I, confirmadas con los *primers* TC, TC1 y TC2 que distinguen los dos grupos principales de *T. cruzi* (I y II) (Fernandes et al., 1998). Se incluyeron dos cepas como controles: Sylvio-X10 (*T. cruzi* I) y una cepa de *Leishmania chagasi* aislada en la zona de Guatiguará (Piedecuesta), utilizada como grupo externo para la construcción de los dendogramas.

Tabla 1. Cepas utilizadas en los análisis.

Origen	Huésped	Código Laboratorio	Código del aislado
Mogotes	Humano	204	MOPI01602
Mogotes	Humano	202	MOPI05902
Mogotes	Humano	209	MOPI01605
San Joaquín	Humano	148	SJSM05806
San Joaquín	Humano	319	SJRI01003
San Joaquín	Humano	132	SJSM08402
Bucaramanga	Humano	259	FCV01001
Bucaramanga	Humano	260	FCV01002
Macaravita	<i>Triatoma dimidiata</i>	743101	743101
Gámbita	<i>Rhodnius prolixus</i>	320101	320101
Mogotes	<i>Rhodnius prolixus</i>	126101	126101
Mogotes	<i>Triatoma dimidiata</i>	1227	1227
San Joaquín	<i>Triatoma dimidiata</i>	1874-01	1874-01
San Joaquín	<i>Triatoma dimidiata</i>	421101	421101
San Joaquín	<i>Rhodnius prolixus</i>	422101	422101
San Joaquín	<i>Rhodnius prolixus</i>	070106	070106
Brazil	Humano	Sylvio-X10-cl1	MHOM/BR/78?/
Piedecuesta	Humano	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>L. chagasi</i>

2.2 CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Las cepas se descripió preservaron, incubando los viales a 37°C hasta su descongelamiento. Posteriormente, se lavaron con solución PBS (*phosphate buffered saline*) y fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se cultivó en medios líquidos LIT (*liver infusion tryptose*) (Camargo et al., 1964) y RE1 (Instituto Nacional de Salud, 1993) (Anexos 1 y 2). Se realizaron cultivos en masa en botellas de 50 ml (durante 5 - 7 días), los cuales fueron lavados con PBS y centrifugados a 2500 rpm durante 20 min. El *pellet* se recuperó en TE (Tris - EDTA pH 8.0) y se almacenó a -20 °C hasta la extracción del ADN.

2.3 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE *T. cruzi*

Se tomaron 250 µl de los extractos almacenados en TE y se trataron con proteinasa K (PROMEGA), hasta una concentración de 100 µg/ml. Las muestras se incubaron a 37 °C durante toda la noche o 56 °C durante 2 h.

La extracción se realizó con fenol - cloroformo en tubos de microcentrífuga, siguiendo el protocolo básico de Sambrook et al., (1989) modificado en el CINTROP (Anexo 3).

El ADN extraído se trató con Ribonucleasa A (Sigma), a una concentración final de 20 µg/ml durante 2 h a 37 °C. Se realizó una extracción con fenol - cloroformo para purificar el ADN.

2.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se empleó el método *dot - spot* estandarizado en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima (LIPT) (Anexo 4). En este método se empleó ADN de bazo de ratón para obtener los patrones de concentración conocida de ADN. El órgano fue macerado en un mortero hasta su completa homogeneización,

adicionando nitrógeno líquido. Posteriormente, el macerado se incubó en tubos de microcentrifuga con solución de lisis a 55 °C (100 mM NaCl; 10 mM Tris - HCl; 25 mM EDTA pH 8.0; 0.5% SDS; 0.1 mg/ml proteinasa K) durante la noche con agitación. Se realizaron dos extracciones con fenol - cloroformo y precipitación con etanol, de acuerdo con el protocolo descrito; el ADN se resuspendió en 200 µl de TE. La calidad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.

Se realizaron diferentes diluciones del ADN de bazo y del marcador de peso molecular (100 bp PROMEGA). Las muestras fueron depositadas en cajas de Petri que contenían 15 ml de 1% agarosa y 1 µl de 1 mg/ml bromuro de etidio. Las cajas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador MacroVue Uvis - 20 (Hofer). Las muestras se observaron como círculos fluorescentes, que se compararon cualitativamente para calcular la concentración del ADN de bazo, en relación con la concentración de ADN de referencia.

Se crearon patrones con el ADN de bazo de 2 a 500 ng/µl que se utilizaron para determinar las concentraciones de las muestras de ADN de las cepas.

2.5 PCR - RFLP DEL ESPACIADOR INTERGÉNICO TRANSCRITO (ITS) DEL ADN RIBOSOMAL DE *T. cruzi*

Esta técnica se estandarizó de acuerdo a lo descrito por Cupolillo et al., (1995) y Santos et al., (2002). Se amplificaron los dos ITS localizados entre la SSU 18S y la LSU 24S, más el gen 5.8S de rRNA (Figura 8). Los *primers* utilizados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Primers* empleados en la amplificación de los ITS.

Oligonucleótidos	Secuencia
ITS1 (32 nt)	5' -GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3'
ITS2 (30 nt)	5' -GCGGGTAGTCCTGCCACACTCAGGTCTG-3'

La reacción de amplificación se estandarizó probando diferentes concentraciones de los componentes del *master mix* (Tabla 3). Para la amplificación se trabajó con el método de *Touchdown* PCR descrito por Don et al., (1991), que consiste en la disminución gradual de la temperatura de alineamiento, partiendo de una más alta de lo apropiado, con el fin de aumentar la especificidad de la reacción. Se variaron las temperaturas de alineamiento y el número de ciclos, manteniendo constantes las temperaturas de extensión y desnaturalización (72 °C y 94 °C) y los tiempos en 1 min (Tabla 4).

Tabla 3. Estandarización del *master mix* para la ITS - PCR .

Componente	Concentraciones
Tris - HCl	10 – 30 mM
KCl	50 – 80 mM
MgCl ₂	1.5 – 4.0 mM
dNTPs	0.18 – 2 μM
Taq	1 – 2.5 U
ADN	10 – 100 ng

Tabla 4. Estandarización rutina de amplificación (*Touchdown* PCR) para la ITS - PCR.

Annealing	Número de ciclos
70	3 - 5
68	3 - 5
65	3 - 5
60	3 - 5
59	2 - 3
58	2 - 5
57	3 - 20
55	3 - 20

Los productos de amplificación fueron digeridos con enzimas de restricción. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 10 μl utilizando: 1 μl Buffer 10X, 1 U enzima, 0.1 mg/ml *Bovine serum albumin* (BSA), 2.65 μl H₂O desionizada y 5 μl de amplificado. Se probaron cuatro endonucleasas: BstU I, Hae III, Rsa I, y Taq I. Los productos de la digestión fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y coloreados con nitrato de plata (Anexo 5). Los geles se fotografiaron con un sistema de fotodocumentación DigiDoc - It System (UVP*).

La variabilidad de las cepas se analizó a partir de una matriz de presencia - ausencia, tomando la presencia de una banda como (1) y su carencia como (0). La matriz de similaridad se construyó con el índice de Jaccard (Jaccard, 1901), definido como: $J = a/a+b+c$, donde a es el número de bandas compartidas entre los dos individuos; b el número de bandas presentes en el primer individuo y ausente en el segundo y c , el número de fragmentos presentes en el segundo y ausentes en el primero. Los árboles se construyeron utilizando UPGMA (*unweighted pair-group method*) (Sokal & Sneath, 1973) con el programa NTSYSpc ver. 2.02J (Rohlf, 1998).

Con el objeto de evaluar la confianza estadística de los resultados obtenidos con el análisis de agrupamiento, se realizó un análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas, utilizando el programa *Free Tree* - ver. 0.9.1.50 (*prerelease version*) (Pavlicek et al., 1999). Los fenogramas se visualizaron con *TreeView* ver. 1.6.6. (Page, 2001).

2.6 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD) DE *T. cruzi*

El procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima, donde esta técnica fue estandarizada con el kit BG (OPBG 01 - 20) de Operon Technologies. Se eligieron los *primers* OPBG-16 y OPBG-17, los cuales mostraron el mayor grado de polimorfismo en cepas de *T. cruzi*. El ADN de todas las cepas fue cuantificado y diluido hasta una concentración de 2 - 10 ng/ μ l.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l que contenían: 0.8 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl; 200 μ M de cada dNTP; 1.5 mM MgCl₂; 1 μ l de ADN y 0.2 μ M de los *primers* OPBG-16 (5´-TGCTTGGGTG-3´) y OPBG-17 (5´-TCCGGGACTC-3´). La amplificación se llevó a cabo en un MiniCycler (MJ Research), la Tabla 5 describe la rutina de amplificación.

Tabla 5. Rutina de amplificación para la RAPD - PCR

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)
1	5 min	95
2	2 min	30
3	1 min	72
4	30 s	95
5	2 min	30
6	1 min	72
7	30 s	95
8	2 min	35
9	1 min	72
10	30 s	95
11	33 veces al paso 8	
12	2 min	35
13	5 min	72
14	∞	4

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 6% y coloreados con nitrato de plata (Anexo 5). Los geles se fotografiaron con un sistema de fotodocumentación DigiDoc – It System (UVP*).

Para el análisis de los datos se construyeron matrices de presencia - ausencia de las bandas observadas, tomando la presencia de una banda como (1) y su ausencia como (0). Se empleó el índice de Jaccard (Jaccard, 1901), para la construcción de la matriz de similaridad y UPGMA (*unweighted pair-group method*) (Sokal & Sneath, 1973) para realizar el análisis de agrupamiento con el programa NTSYSpc ver. 2.02j (Rohlf, 1998).

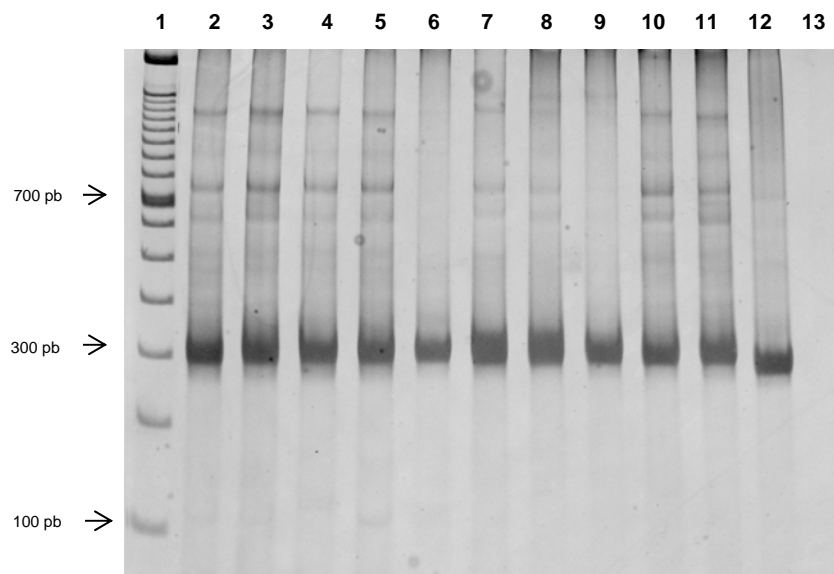
Se realizó bootstrapping con 1000 réplicas utilizando el programa *Free Tree* – ver. 0.9.1.50 (*prerelease ver.*) (Pavlicek et al., 1999), para evaluar la confianza estadística de los grupos formados en el análisis de agrupamiento. Los fenogramas se visualizaron con la ayuda del programa *TreeView* ver. 1.6.6. (Page, 2001).

3. RESULTADOS

3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Se utilizaron los *primers* TC, TC1 y TC2 para confirmar que las cepas incluidas en el estudio correspondían a *T. cruzi* I. Las 17 cepas de analizadas, exhibieron el patrón correspondiente a *T. cruzi* I. En La Figura 10, se observa la banda de 300 pb que caracteriza a este grupo.

Figura 10. Caracterización de aislados de humano y vector con los *primers* TC, TC1 y TC2. Se observa la banda de 300 pb que caracteriza a *T. cruzi* I. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (100pb). carriles 2 a 13: 204, 209, 132, 259, 260, 743I01, 126I01, 320I01, 421I01, 422I01, Sylvio-X10, control de reacción.



3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Una vez extraído el ADN total de *T. cruzi*, se cuantificó con el método *dot - spot*. Los patrones para la cuantificación se construyeron con ADN de bazo de ratón a una concentración inicial de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se realizaron diluciones entre 2.0 y 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$ del ADN de bazo, para utilizarlas como referencia. Del ADN total de *T. cruzi* se realizaron

diluciones 1/5, 1/10 y 1/20, las cuales fueron depositadas en la agarosa junto con los patrones de bazo. La Tabla 6 muestra las concentraciones de ADN de todas las cepas.

Tabla 6. Cuantificación por el método *dot - spot* del ADN de los aislados.

CEPA	CONCENTRACIÓN (ng/μl)
204	1200
209	1200
148	120
132	1200
259	600
260	650
202	650
319	2500
1874-01	1300
743I01	1300
126I01	300
320I01	1300
421I01	600
422I01	1200
070I06	2500
1227	1300
Sylvio-X10	2500
<i>L. chagasi</i>	300

3.3 PCR - RFLP DE LOS ESPACIADORES INTERGÉNICOS TRANSCRITOS (ITS) DE *T. cruzi*.

3.3.1 Amplificaciones y digestión con enzimas de restricción. La Tabla 7 muestra la reacción de amplificación estandarizada. El programa utilizado se muestra en la Tabla 8.

Se obtuvo un amplificado de aproximadamente 1300 pb para todas las cepas de *T. cruzi* I y de 1100 pb para la cepa de *L. chagasi*. No se observa variación en el tamaño de los ITS entre las cepas de *T. cruzi* analizadas. Se aprecia una banda a la altura de 1000 pb en algunos de los aislados (Figura 11). Este fragmento no se eliminó con las altas temperaturas de alineamiento de la *Touchdown* PCR, ni con otros aditivos comúnmente utilizados para mejorar la especificidad de la reacción (datos no mostrados).

Figura 11. Amplificación de los ITS de las cepas seleccionadas de *T. cruzi* y dos aislados de referencia. El carril 10 corresponde al marcador de peso DNA Ladder Mix (Fermentas). Carriles 1 - 9: 204, 209, 132, 743I01, 320I01, 422I01, Sylvio-X10, *L. chagasi*, control de reacción.

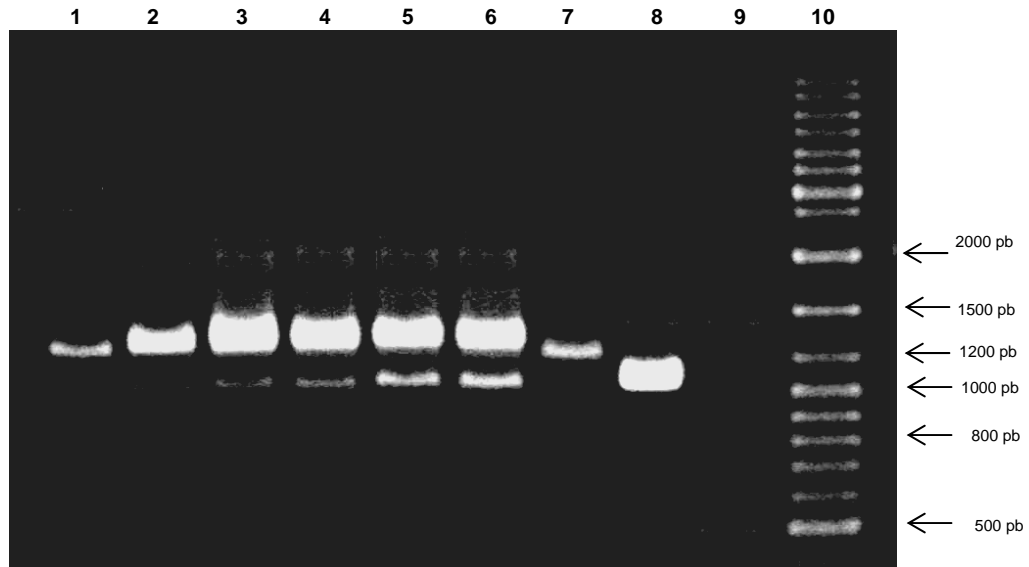


Tabla 7. Mezcla de reacción estandarizada para la ITS - PCR.

Componente	Concentraciones	Cantidad (µl)
Buffer 10X : Tris – HCl	26mM	
KCl	65 mM	3.25
MgCl ₂	4 mM	2.0
dNTPs	100 µM	2.5
Taq polimerasa	1.25 U	0.25
ITS1	0.16 µM	1.0
ITS2	0.16 µM	1.0
ADN	30 -50 ng	4.0
H ₂ O		11.0
Volumen final		25.0

Tabla 8. Rutina de amplificación para la ITS - PCR.

PASO	TIEMPO	(°C)
1	5 min	95
2	1 min	94
3	1 min	70
4	1 min	72
5	4 veces al paso 2	
6	1 min	94
7	1 min	68
8	1 min	72
9	4 veces al paso 6	
10	1 min	94
11	1 min	65
12	1 min	72
13	4 veces al paso 10	
14	1 min	94
15	1 min	60
16	1 min	72
17	4 veces al paso 14	
18	1 min	94
19	1 min	59
20	1 min	72
21	2 veces al paso 18	
22	1 min	94
23	1 min	58
24	1 min	72
25	2 veces al paso 22	
26	1 min	94
27	1 min	57
28	1 min	72
29	8 veces al paso 26	

Los productos de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción Rsa I, Bst UI, Hae III y Taq I. Las enzimas Hae III y Taq I mostraron patrones de restricción entre 100 y 900 pb (Figura 12), mientras RsaI y BstU I presentaron bandas menores de 100 pb, hasta 900 a 1000 pb (Figura 13). Para los análisis de polimorfismo, se tuvieron en cuenta todas las bandas inequívocas entre los 150 - 900 pb para las enzimas TaqI y HaeIII. Para Rsa I y Bst UI, se incluyeron las bandas menores de 100 hasta 950 pb.

En general, existe similitud en los perfiles obtenidos con las cuatro enzimas entre las cepas de vector y humano. Sin embargo, se observan algunas diferencias, especialmente entre las cepas de vector, mientras los perfiles de los aislados de humano aparecen más homogéneos (Figuras 12 y 13).

Con la enzima Hae III, se obtuvo heterogeneidad en la banda comprendida entre 400 y 500 pb (Figura 13a). Especialmente, en las cepas 743I01 y 421I01 se observa un complejo de

bandas en este rango, que no se aprecia en el resto de las cepas (Figura 12a, carriles 16 y 17). En los perfiles obtenidos con la enzima Taq I (Figura 13b) se evidencia una considerable homogeneidad entre las cepas de humano, mientras en las de vector pueden observarse algunas diferencias. El aislado 1227 por ejemplo, difiere de la mayoría de las cepas en la banda entre 800 y 900 pb.

Con la enzima Bst UI, se obtuvieron patrones bastante homogéneos entre todas las cepas. Sin embargo se observan algunas bandas particulares menores de 100 pb y en el rango de 100 a 250 pb. En el caso de Rsa I, pueden apreciarse diferencias en las bandas menores de 300 pb, especialmente entre los aislados de vector como se anotó anteriormente.

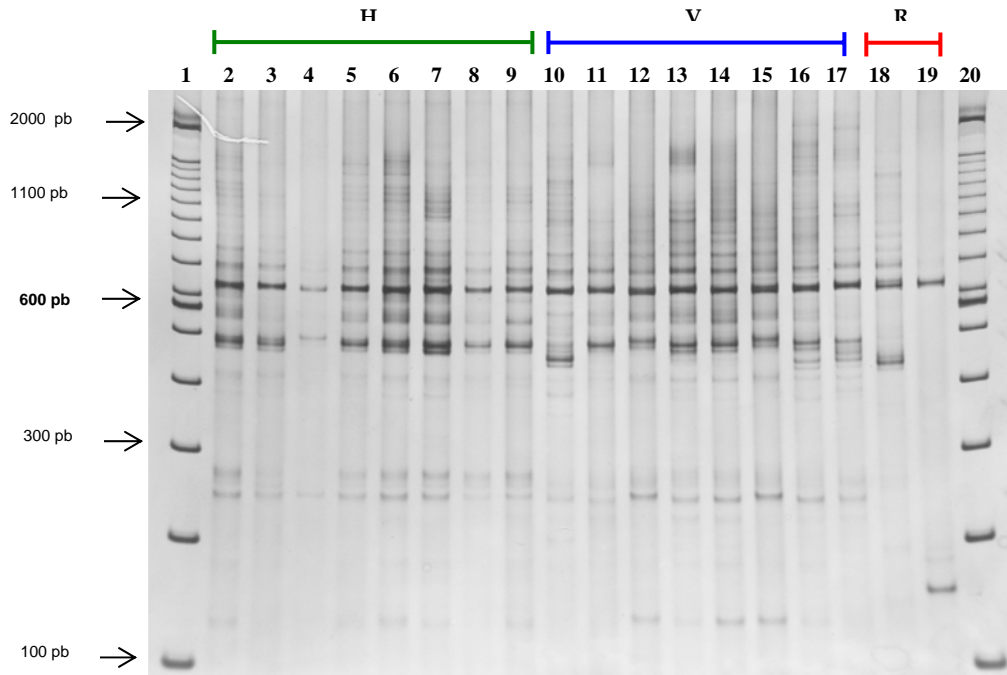
La cepa de referencia Sylvio-X10, muestra bandas similares a las cepas de *T. cruzi* analizadas pero con diferencias en los pesos moleculares. La cepa de *L. chagasi*, presenta un bandeo único.

Como puede observarse en las Figuras 12 y 13, la suma de los fragmentos obtenidos con las diferentes enzimas, excede considerablemente el tamaño del amplificado original de 1300 pb. Este fenómeno es poco evidente con el aislado de *L. chagasi*. Este resultado supone la existencia de cepas compuestas por mezclas de diferentes clones.

3.3.2 Análisis fenético. El anexo F muestra la matriz de presencia - ausencia construida a partir de los perfiles obtenidos. La matriz de similaridad se detalla en el Anexo G. El análisis de agrupamiento muestra dos grupos principales constituidos por los aislados de humano y vector con un nivel de similaridad entre ellos de aproximadamente 0,50. La cepa de referencia Sylvio-X10 muestra una baja similaridad con el resto de los aislados de *T. cruzi*, agrupándose a un nivel de 0,34. *L. chagasi* forma el grupo externo con 0,1 de similaridad (Figura 14).

Figura 12. Perfiles de restricción con las enzimas Hae III (a) y Taq I (b). **H**, humano; **V**, vector; **R**, referencia. Los carriles 1y 20 corresponden al marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco). Carriles 2 - 9, aislados de humano: 204, 319, 202, 260, 209, 259, 148, 132; carriles 10 - 17, aislados de vector: 1227, 422I01, 126I01, 1874-01, 320I01, 070I06, 743I01, 421I01; carril 18, Sylvio-X10; carril 19 *L. chagasi*.

a) Hae III



b) Taq I

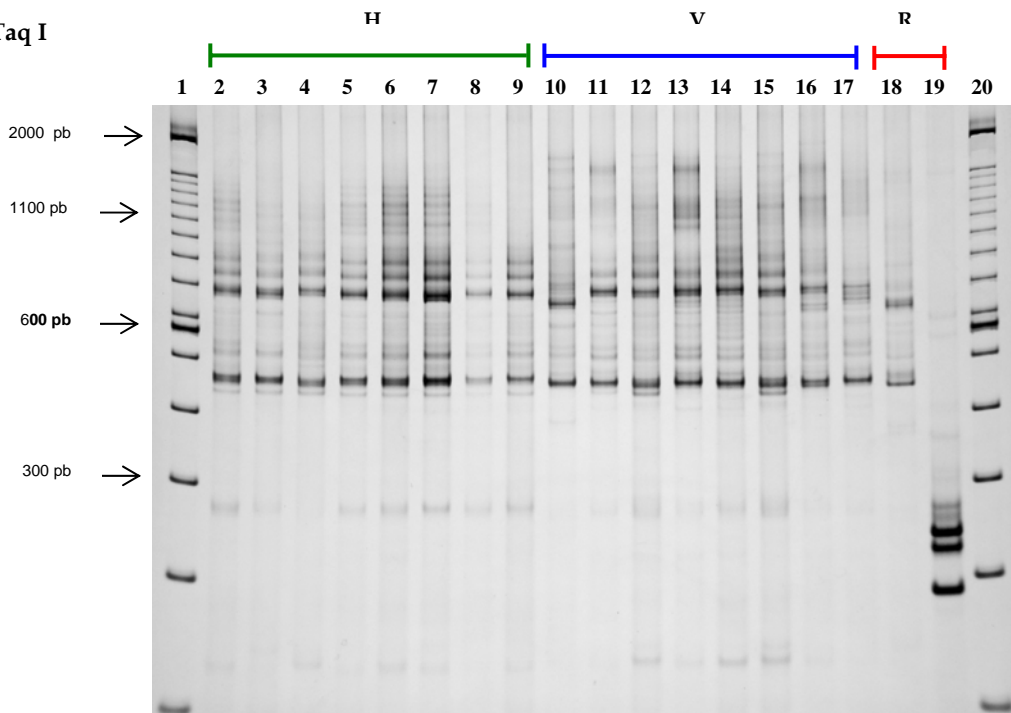
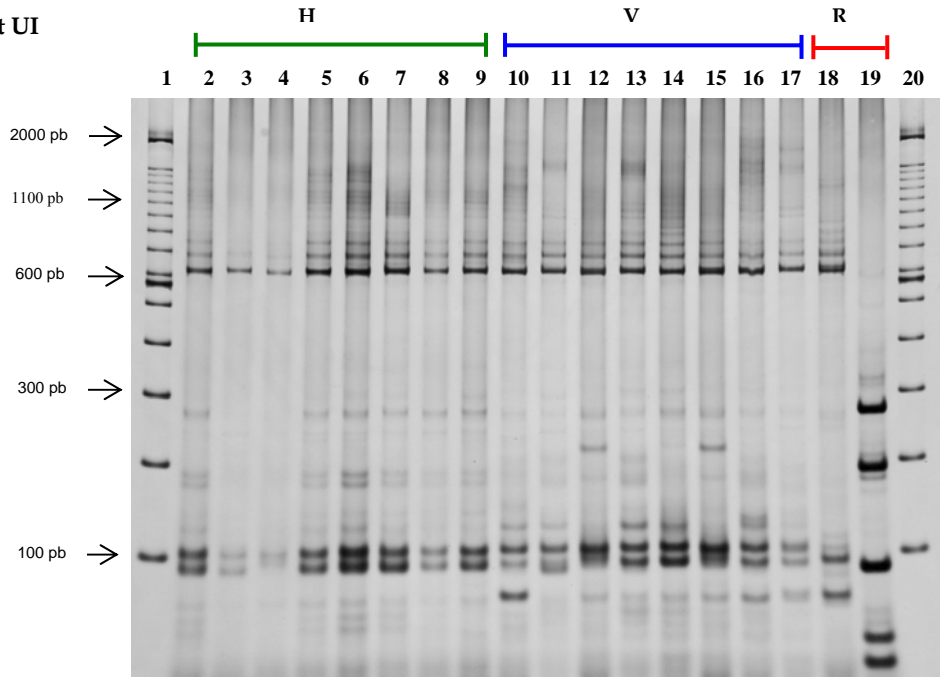


Figura 13 . Perfiles de restricción con las enzimas Bst UI (a) y Rsa I (b). **H**, humano; **V**, vector; **R**, referencia. Los carriles 1y 20 corresponden al marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco). Carriles 2 - 9, aislados de humano: 204, 319, 202, 260, 209, 259, 148, 132; carriles 10 - 17, aislados de vector: 1227, 422I01, 126I01, 1874-01, 320I01, 070I06, 743I01, 421I01; carril 18, Sylvio-X10; carril 19 *L. chagasi* .

a) Bst UI



b) Rsa I

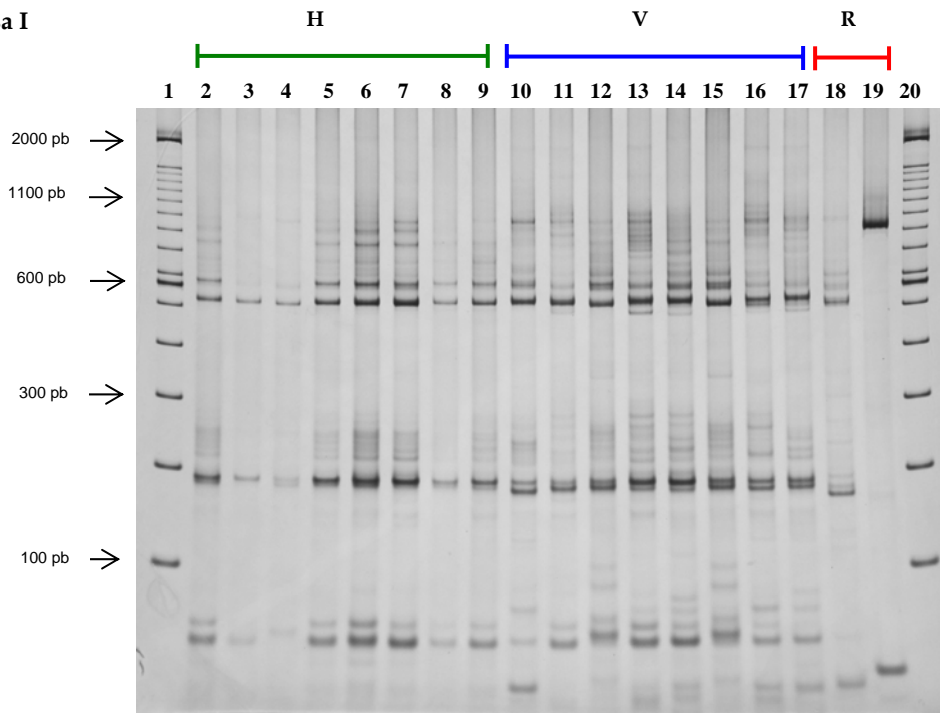
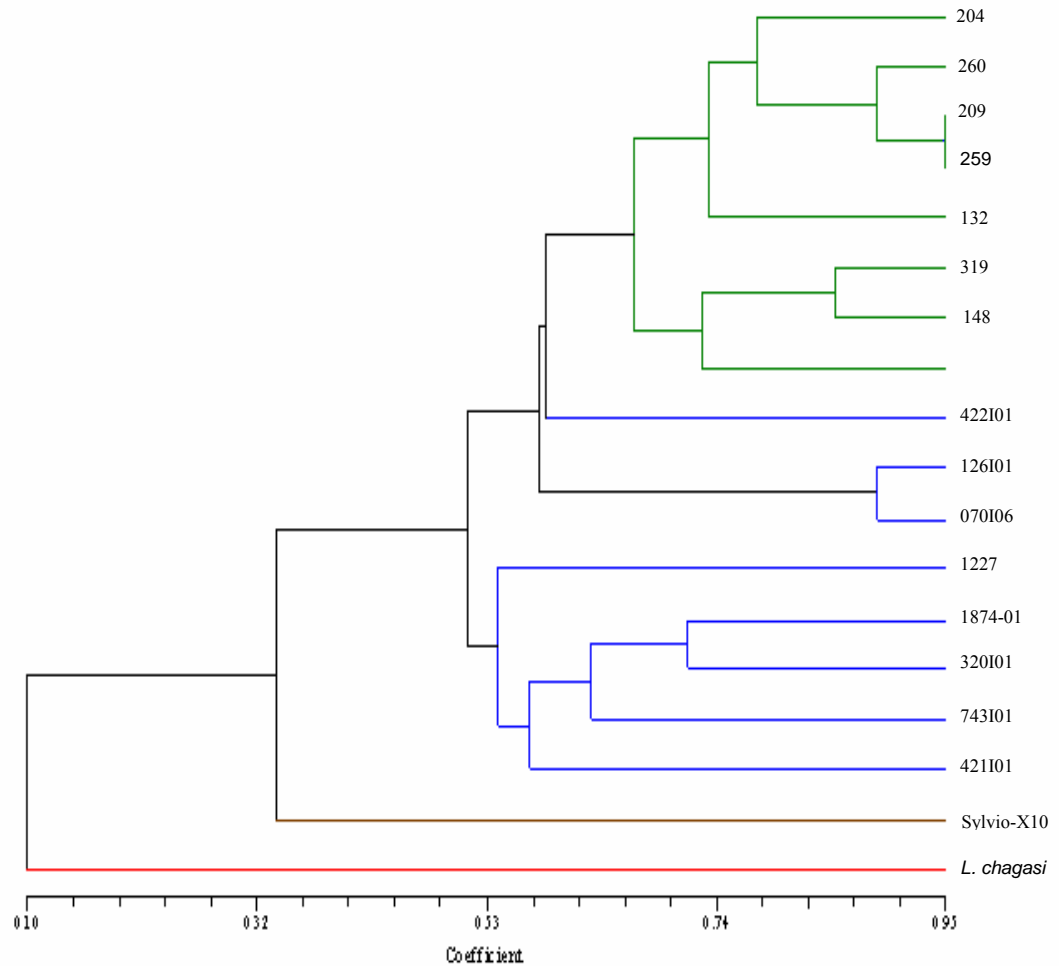


Figura 14. Dendrograma generado con NTSYSpc, a partir de los datos de ITS - RFLP. Las cepas de vector se destacan en azul y las de humano en verde. Los aislados de referencia Sylvio-X10 y *L. chagasi*, corresponden a las ramas de color café y rojo respectivamente.



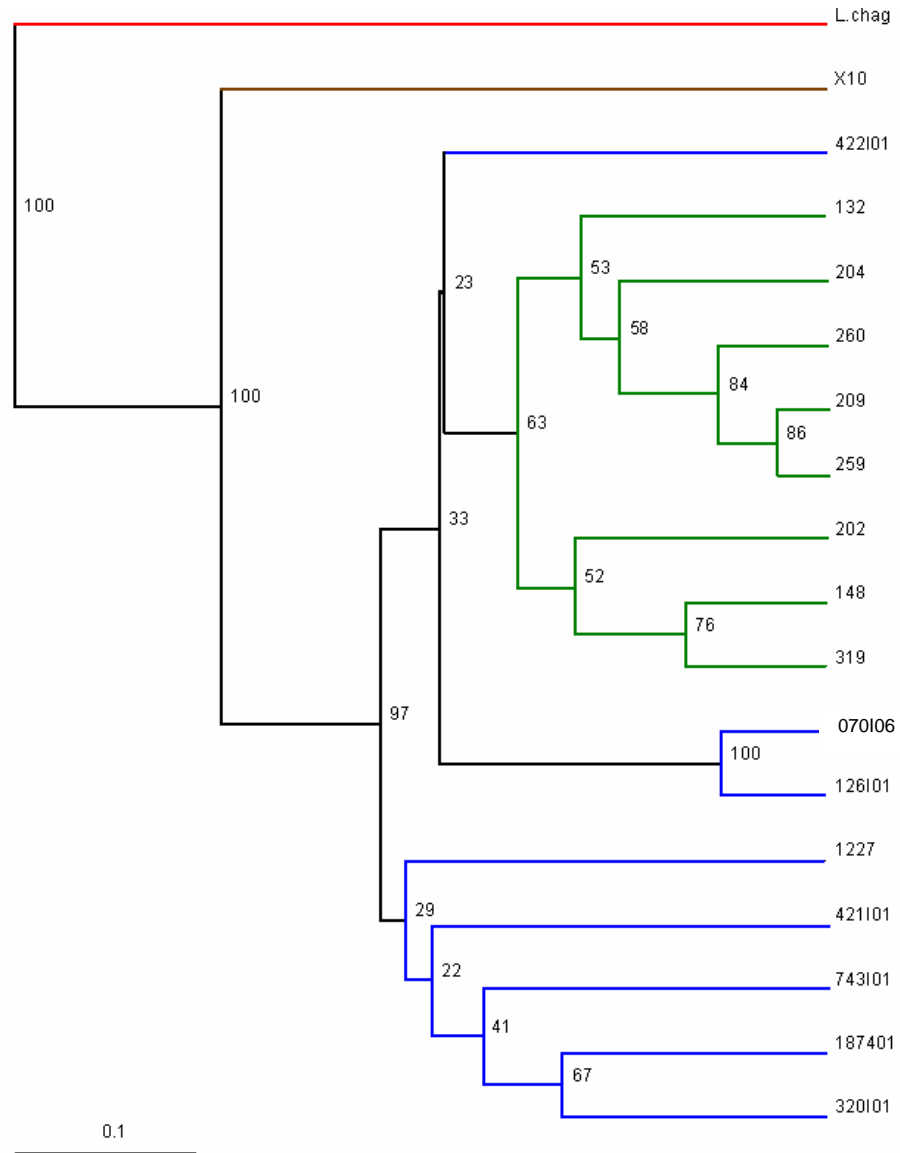
El primer grupo está compuesto por las ocho cepas de humano y tres aislados de vector. Las cepas de humano forman un solo *cluster* y se agrupan a un nivel de similaridad de 0,66. Los aislados de vector se encuentran en ramas separadas: 070I06 y 126I01 integrando un subgrupo y la cepa 422I01 se agrupa con las de humano a un nivel de 0,58. En el segundo grupo aparecen las cepas de vector restantes agrupándose con similaridad de 0,54.

En general, puede concluirse una diferenciación entre las cepas de vector y humano con la técnica de ITS - RFLP. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los aislados 070I06, 126I01 y 422I01 guardan mayor semejanza con los de humano, aunque se agrupan en *clusters* separados. La similaridad intra grupo de los aislados es superior a 0,54, evidenciándose una mayor semejanza entre los aislados de humano, que entre los cinco de vector que componen un grupo aparte (ver Figura 14).

3.3.4 Bootstrapping. Con la ayuda del programa *FreeTree* se aleatorizó la matriz de datos 1000 veces. La Figura 15 muestra el dendrograma generado; los números entre los nodos indican los valores de *bootstrap* obtenidos para cada grupo.

La topología general del árbol obtenido con NTSYS se conserva, los 16 aislados de análisis formaron dos grupos principales. El primero compuesto por las ocho cepas de humano integrando un solo *cluster*, junto con las cepas de vector 070I06, 126I01 y 421I01. En el segundo se agrupan los cinco aislados de vector restantes. La cepa de referencia Sylvio-X10 se agrupa fuera del *cluster* de los aislados de análisis y *L. chagasi* forma el grupo externo. Las cepas de humano y vector se agrupan con una confianza del 97%. La mayoría de los valores de *bootstrap* para los subgrupos compuestos por las cepas de vector y humano son inferiores al 60%. Se destaca que el cluster integrado por los aislados de humano se agrupa con confianza del 63%, mientras los *clusters* compuestos por los aislados 070I06, 126I01 y 422I01 con las cepas de humano, se encuentran pobremente soportados (23 y 33%).

Figura 15. Dendrograma generado con *FreeTree*, a partir de los datos de ITS - RFLP. Las cepas de vector se indican en azul y las de humano en verde. Los aislados de referencia Sylvio-X10 y *L. chagasi*, corresponden a las ramas de color café y rojo respectivamente.



3.4 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DEL ADN POLIMÓRFICO (RAPD) DE *T. cruzi*

Se realizó amplificación aleatoria del ADN de los diferentes aislados utilizando los *primers* OPBG-16 y OPBG-17 (Figuras 16 y 17). Se realizaron réplicas con cada iniciador para evaluar la reproducibilidad de los patrones generados.

Puede observarse con el primer OPBG-16 una clara diferencia entre los patrones de amplificación de las cepas de vector y humano y un bandeo particular en las cepas de referencia (Figura 16). Las cepas de humano presentan una gran semejanza, mostrando una banda representativa de aproximadamente 1100 pb. Las cepas de vector exhiben entre sí patrones similares pero diferentes a las cepas de humano, a excepción de los aislados 070I06 y 126I01, que muestran un bandeo semejante al de estas últimas, con la banda descrita de 1100 pb (Figura 16, carriles 6 y 9).

Con el primer OPBG-17 se obtuvo un bandeo más homogéneo entre todas las cepas. Se observan algunas bandas características; especialmente entre los 500 y 800 pb para las cepas de vector. Las cepas de referencia amplificaron patrones menos específicos que lo observado con el primer OPBG-16, pero conservan algunas particularidades que las diferencian del grupo de análisis (Figura 18).

Figura 16. Patrones de RAPD con el primer OPBG-16. **H:** humano; **V:** vector; **R:** referencia. Los carriles 1 y 20 corresponden al marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco). Carril 2, *L. chagasi*; carril 3, Sylvio-X10; carriles 4 -11, aislados de vector: 421I01 743I01, 070I06, 320I01, 1874-01, 126I01, 422I01, 1227; carriles 12 - 19, aislados de humano: 132, 148, 259, 209, 260, 202, 319, 204.

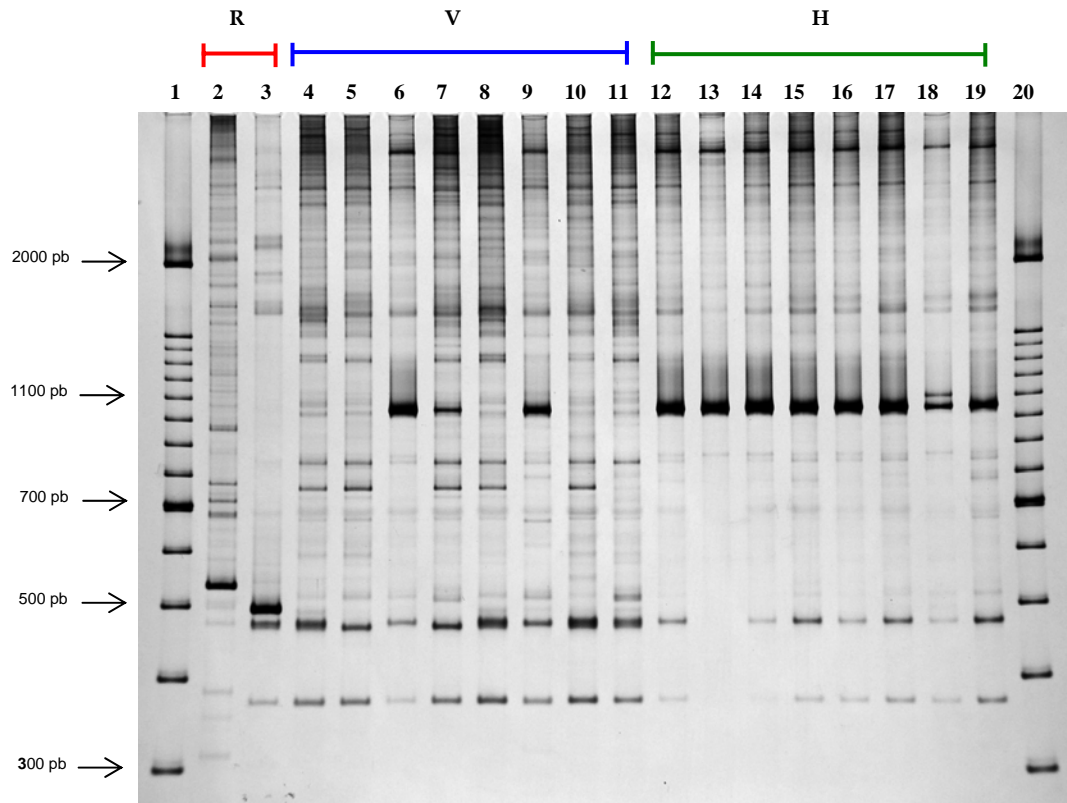
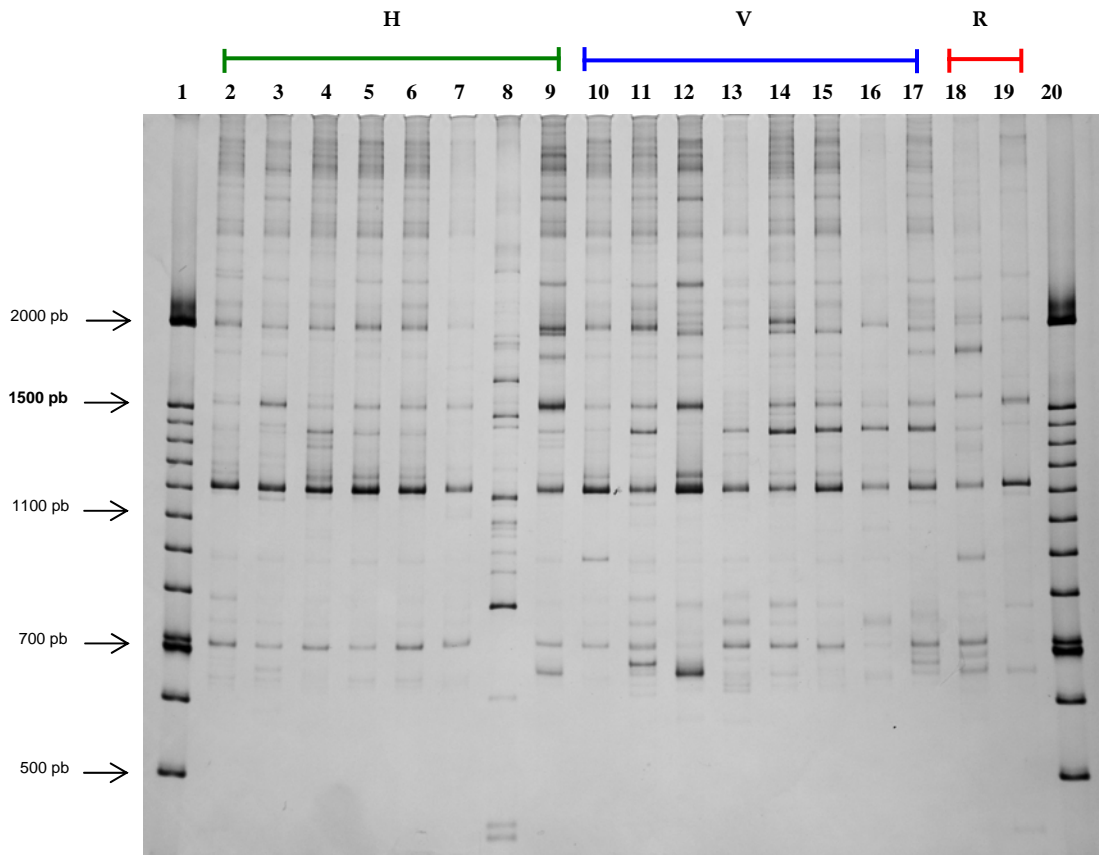
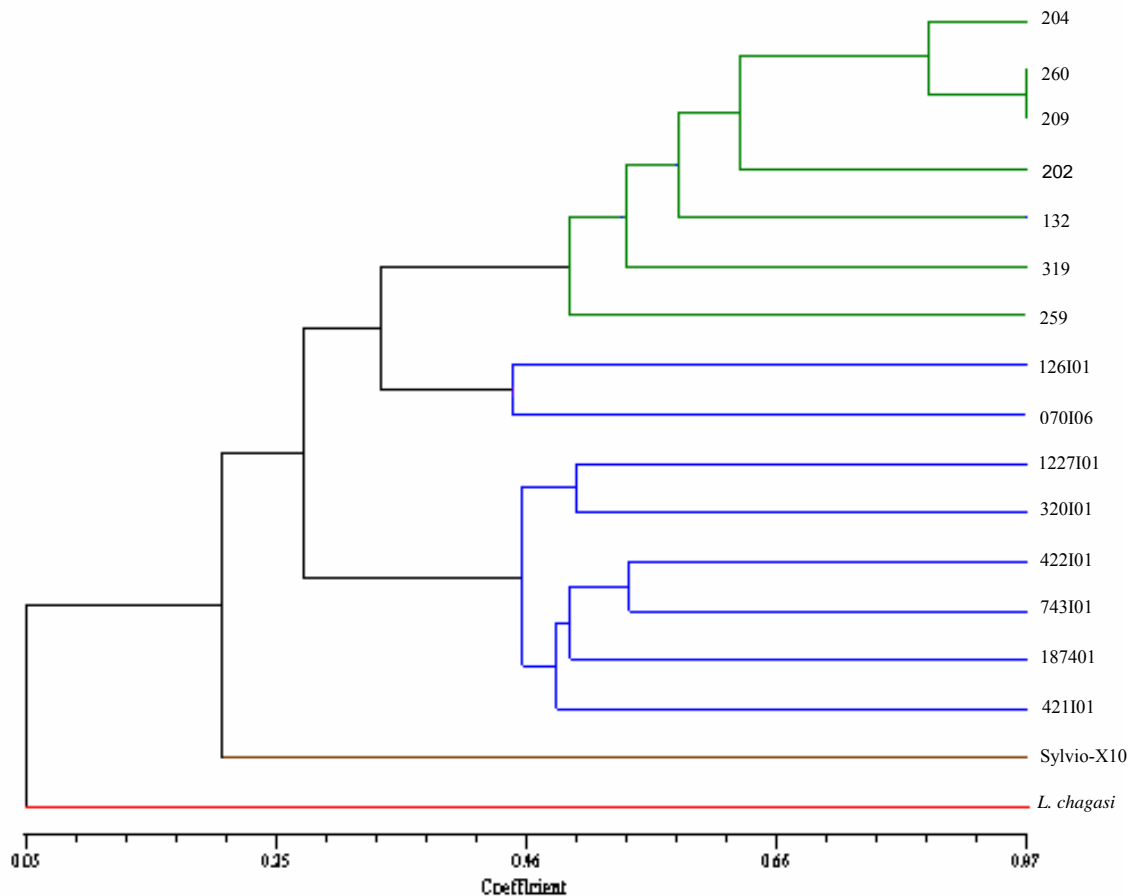


Figura 17. Patrones de RAPD con el primer OPBG-17. **H:** humano; **V:** vector; **R:** referencia. Los carriles 1 y 20 corresponden al marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco). Carriles 2 - 9, aislados de humano: 204, 319, 202, 260, 209, 259, 148, 132; carriles 10 - 17, aislados de vector: 1227, 422I01, 126I01, 1874-01, 320I01, 070I06, 743I01, 421I01; carril 18, Sylvio-X10; carril 19 *L. chagasi*.



3.4.1 Análisis fenético. A partir de los patrones de amplificación, se construyó una matriz de presencia - ausencia, teniendo en cuenta un total de 163 fragmentos, entre 200 y 2000 pb (Anexo H). Esta matriz fue analizada con la ayuda del programa NTSYS ver. 2.02j aplicando el índice de Jaccard, que generó una matriz de similaridad (Anexo I) con la que se construyó un dendrograma utilizando UPGMA (Figura 18). La cepa 148 debió eliminarse del análisis debido a que no fue posible obtener un patrón conservado en las amplificaciones con el primer OPBG-17.

Figura 18. Dendrograma generado con NTSYS, a partir de los datos de RAPD con los *primers* OPBG-16 y OPBG-17. Se empleó el coeficiente de Jaccard y UPGMA. Las cepas de vector se indican en azul y las de humano en verde. Los aislados de referencia Sylvio-X10 y *L. chagasi*, corresponden a las ramas de color café y rojo respectivamente.



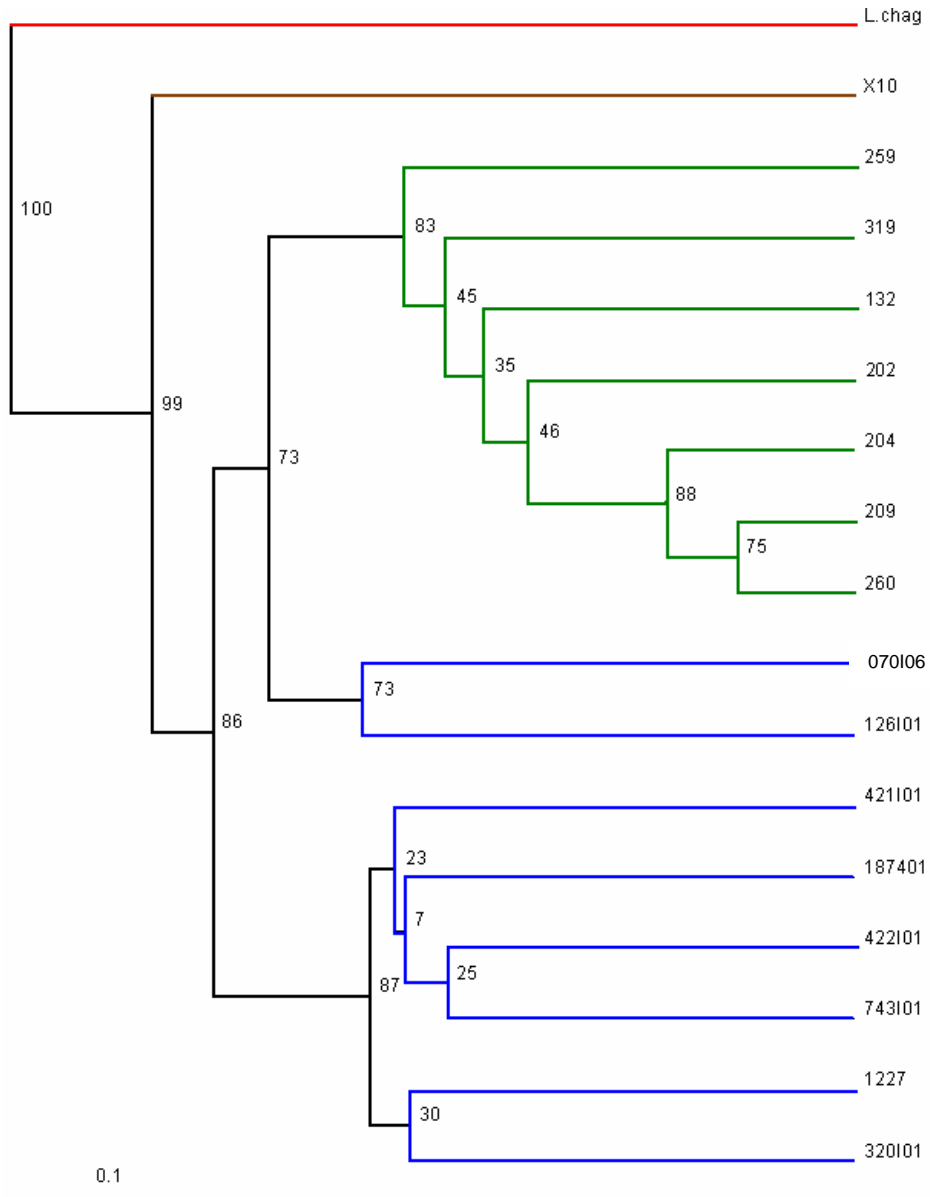
Se formaron dos grupos principales entre las cepas de humano y vector, con nivel de similaridad entre ellos de 0,27. El primer grupo reúne todas las cepas de humano, agrupadas a un nivel de 0,58. Las cepas 070I06 y 126I01, conforman un *cluster* con similaridad de 0,38 respecto al subgrupo de los aislados de humano. El segundo *cluster* está compuesto por las cepas de vector restantes, agrupadas a un nivel de 0,56. La cepa de referencia Sylvio-X10 se agrupa con las de humano y vector a nivel de 0,20. *L. chagasi* forma el grupo externo con similaridad de 0,05.

Al igual que en análisis de ITS - RFLP, las cepas de vector presentan una menor similaridad intra grupo que las cepas de humano. Se destaca que los aislados 070I06 y 126I01, como ocurrió en el análisis de ITS - RFLP, se agruparon con las cepas de humano. Por el contrario, 422I01 que formaba un *cluster* con los aislados de humano en este análisis, se agrupó con las cepas de vector.

3.4.2 Bootstrapping. La Figura 19 muestra el dendrograma obtenido utilizando el programa *FreeTree*, aleatorizando 1000 veces la matriz de datos. Los valores de *bootstrap* se encuentran indicados entre los nodos.

La topología general del árbol generado por NTSYS se mantuvo constante. La confianza estadística para los grupos más representativos supera el 70%. Las cepas de humano forman un solo *cluster* con un soporte de 83%; mientras cinco de los aislados de vector se agrupan con confianza del 87%. Las cepas 070I06 y 126I01 nuevamente se agrupan con las de humano formando un subgrupo con soporte del 73%. Se observa que la confianza para la mayoría de los grupos, mejoró con respecto a lo obtenido con los datos de ITS - RFLP, en especial el soporte para el *cluster* de las seis cepas de vector y el grupo conformado por los aislados de humano, 070I06 y 126I01.

Figura 19. Dendrograma generado con *FreeTree*, a partir de los perfiles de RAPD con los *primers* OPBG-16 y OPBG-17. Se empleó el coeficiente de Jaccard, UPGMA y *Bootstrap* con 1000 réplicas. Las cepas de vector se indican en azul y las de humano en verde. Los aislados de referencia Sylvio-X10 y *L. chagasi*, corresponden a las ramas de color café y rojo respectivamente.



4. DISCUSIÓN

Por medio de la caracterización de 16 cepas de humano y vector y dos cepas de referencia de *T. cruzi* con las técnicas de ITS - RFLP y RAPD, se determinaron polimorfismos de los aislados con el fin de establecer diferencias entre estos dos grupos. Los resultados indican que existe variabilidad genética entre las cepas de vector y humano estudiadas, en concordancia con El Modelo Histotrópico Clonal propuesto por Macedo & Pena (1998 y 2002) (Figura 9).

El modelo establece que el paso del hospedero invertebrado al humano, involucra un poderoso mecanismo de selección, influenciado por el sistema inmunológico de este último. De este modo, los clones del parásito que no estén adaptados a las nuevas condiciones ambientales, no sobrevivirán (Macedo & Pena 1998, Macedo et al., 2002). Es de esperarse entonces, que las cepas aisladas de vector y humano muestren diferencias.

Los análisis de agrupamiento a partir de los datos de ITS - RFLP y RAPD revelan de manera general, discrepancia entre los dos grupos de aislados. La mayoría de las cepas de vector integran un *cluster* separado de los aislados de humano. Sin embargo, los aislados de vector 070I06, 126I01 y 422I01, parecen guardar mayor similitud con las cepas de humano (Figuras 14 y 18). En ambos análisis, las cepas 070I06 y 126I01, se asociaron con las cepas de humano, conformando un grupo separado. La similaridad con estas últimas se evidencia especialmente con el primer OPBG-16 (Figura 16), con el cual comparten una banda de aproximadamente 1100 pb, característica de los aislados de humano.

Esta similaridad no parece guardar relación con el origen geográfico. La cepa 070I06 proviene de San Joaquín y la 126I01 de Mogotes. Otras cepas de vector provienen de estas localidades y sin embargo, se agrupan fuera de este *cluster*. Una posible explicación sería la de un proceso de homogenización dentro del ciclo de transmisión doméstico. Algunas

poblaciones de *T. cruzi*, podrían haber sufrido un proceso de aislamiento, influenciado por factores geográficos y ecológicos que impiden el flujo génico con las poblaciones selváticas. De hecho, estos dos aislados provienen de triatomíneos colectados en áreas urbanas, donde la presencia de reservorios selváticos y animales sinántropicos es limitada. Con el tiempo, las cepas van perdiendo su heterogeneidad a medida que son seleccionadas por los humanos y empiezan a circular las mismas poblaciones de parásitos dentro del ciclo. Este fenómeno podría presentarse de manera discontinua: condiciones de aislamiento particulares de una zona, e incluso una vivienda, podrían aislar las poblaciones de parásitos de tal manera que con el tiempo, se homogenicen entre los vectores y humanos de dicha zona. Esto explicaría el por qué no se observa este fenómeno en todas las cepas de *T. cruzi* estudiadas.

Por otra parte, la cepa 422I01, demuestra mayor similaridad con las cepas de humano en el análisis de RFLP, mientras en el dendrograma construido a partir de los RAPD, se agrupa con la mayoría de las cepas de vector (Figuras 14 y 18). El análisis de la matriz de datos muestra que el carácter Rsa18 (Anexo F) es el responsable del agrupamiento de esta cepa con los aislados de humano. Al eliminar este carácter, se obtiene un fenograma en el que 422I01 se agrupa con el resto de las cepas de vector (Anexo J). De este modo, el grupo integrado por este aislado y las cepas de humano se encuentra pobremente soportado, como lo indica el *bootstrap* obtenido para este grupo (23%). Adicionalmente, en el dendrograma derivado de los RAPD, 422I01 se agrupa con la mayoría de las cepas de vector y la confiabilidad de este grupo es alta (87%). Por lo tanto, existe una mayor probabilidad de que esté relacionado con este grupo de aislados.

La topología general de los árboles se mantuvo cuando se aleatorizaron las matrices de datos mediante *bootstrapping*. Los *clusters* principales se conservan y las cepas de vector similares a las de humano, se agruparon de la misma forma. La cepa de referencia de *T. cruzi* I incluida en el estudio (Sylvio-X10), se agrupa con las cepas de humano y vector con una baja similaridad en ambos análisis (0.34 y 0.20). A pesar de que esta cepa corresponde a un aislado de humano de origen brasilero, difiere de las cepas de humano, lo que se

evidencia en los perfiles obtenidos con ambas técnicas, en especial con los RAPD (figuras 12, 13 y 16). Se ha establecido que las cepas de *T. cruzi* I en los países del Cono Sur, se asocian preferencialmente con el ciclo selvático de transmisión de la Enfermedad de Chagas (Fernandes, 1998). Sin embargo, en Colombia *T. cruzi* I se asocia con los ciclos doméstico y selvático (Saravia et al., 1987; Rodríguez et al., 1998), de manera que una amplia divergencia entre los aislados de *T. cruzi* I colombianos y de otras latitudes es factible.

El grupo conformado por las cepas de vector y humano se encuentra soportado por un *bootstrap* de 97%, en el dendrograma derivado de ITS - RFLP (Figura 15). Sin embargo, el grupo compuesto por las cepas de vector presenta un valor bajo (29%), al igual que el grupo integrado por las tres cepas de vector y las de humano (33%). El subgrupo de las cepas de humano se encuentra medianamente soportado con un 63%. En contraste, en el análisis de RAPD la confiabilidad mejora y los principales grupos (vectores/humanos) observan valores superiores al 70% (Figura 19). Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que los RFLP, involucran una secuencia de unos 1300 pb, que es poco representativa del genoma de *T. cruzi* (100 - 200 X 10⁶ pb) (Silveira, 2001). Los RAPD por el contrario, permiten evaluar muchas regiones arbitrarias de este último (Williams et al., 1990), lo que contribuiría a aumentar la concordancia de los datos y por lo tanto, el soporte de los grupos formados.

El análisis de ITS - RFLP muestra que los productos de restricción, exceden considerablemente el amplificado original de 1200pb. Este fenómeno fue reportado por otros autores (Cupolillo et al., 1995; Lee & Taylor, 1992; Schlotterer et al., 1994) y obedece a la heterogeneidad dentro del ITS, explicada por la multiclonalidad de los aislados: diferentes clones, poseen variaciones en la secuencia de los ITS y por lo tanto, en los sitios de restricción para las diferentes enzimas. La multiclonalidad de las cepas de *T. cruzi* ha sido documentada por varios autores (Tibayrenc et al., 1986; Macedo et al., 1992; Oliveira et al., 1998, 1999; Macedo et al., 2002). En áreas endémicas, es probable que los humanos se vean sometidos a múltiples contactos con diferentes triatominos. Esto propicia la

formación de poblaciones multiclonales en los huéspedes tanto invertebrados como vertebrados, de tal manera que las cepas aisladas de los diferentes hospederos, corresponden a cepas multiclonales (Macedo et al., 2002).

Adicionalmente, la amplificación de los ITS produjo una banda alrededor de los 1000 pb, que no fue posible eliminar con la *Touchdown* PCR. Durante la estandarización, también se utilizaron varios aditivos comúnmente utilizados para mejorar la especificidad de la PCR, como la formamida y el DMSO (Chakrabarti & Schutt) (datos no mostrados). Sin embargo, tampoco sirvieron para desvanecer este fragmento, de manera que se trata de una banda específica. Existen secuencias de ADN genómico similares a los genes normales, pero consideradas como no funcionales llamadas pseudogenes. Estos pueden contener copias incompletas de la secuencia codificante del gen y están presente en muchos organismos (Gibson, 1994).

Hartmann et al., (2001), amplificaron los ITS y la región codificante 5.8S del cactus *Lophocereus* y obtuvieron dos fragmentos: el primero de 700 pb y una banda inferior débil de 550 pb. Concluyeron que este organismo posee dos operones del rADN, uno funcional y otro que se trata de un pseudogen y corresponde a la banda de 550 pb. Estos resultados son muy similares a lo observado con nuestras cepas y la presencia de un pseudogen podría explicar la banda de 1000 pb. Debido a que no había sido reportada anteriormente por los autores que han amplificado la región ITS en *T. cruzi* (Fernandes et al., 1999; Santos et al.; 2002; Cuervo et al., 2002), podría tratarse del polimorfismo específico de un clon local, debido a que este fragmento se observa con intensidad variable en las diferentes cepas (Figura 11).

Por otra parte, la similitud de los aislados locales en los análisis de agrupamiento, es superior a 0.45 de manera general (Figuras 14 y 18). Sin embargo, en el análisis derivado de RAPD, la similitud entre el grupo compuesto por los aislados de humano, 070I06, 126I01 y el grupo de aislados de vector restantes, es de sólo 0,30 (Figura 18). De modo semejante ocurre entre el *cluster* compuesto por las aislados 070I06, 126I01 y las cepas de

humano, cuya similaridad es de 0,38. Esto resalta aún más la discrepancia entre estos dos grupos, teniendo en cuenta que por separado, demuestran similaridades entre 0.45 y 0.87 (Anexo I).

Diferentes estudios realizados en Colombia, evidencian una alta heterogeneidad entre las cepas de *T. cruzi* (Widmer et al., 1985, Saravia et al., 1987; Rodríguez et al., 1998; Triana et al., 1999; Jaramillo et al., 1999; Ruiz-Garcia et al., 2001; Montilla et al., 2002; Rodríguez et al., 2002). En este trabajo se emplearon únicamente cepas de *T. cruzi* I, de origen doméstico y regiones comprendidas dentro del mismo departamento (Santander), lo que explicaría los niveles de similaridad observado. Las investigaciones realizadas anteriormente en nuestro país, incluyeron cepas provenientes de diversos hospederos, ciclos de transmisión y/o grupos de *T. cruzi*, condiciones que explican la alta heterogeneidad encontrada entre las cepas colombianas.

La variabilidad de las poblaciones de *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada, no solamente para evaluar las características genéticas particulares del parásito en los diferentes ciclos de transmisión y hospederos, sino con el objetivo de relacionar estas particularidades con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Fernandes et al., 2003; Macedo et al., 2004). En Colombia, la mayoría de los trabajos de caracterización se han centrado en el análisis de los perfiles de isoenzimas (Widmer et al., 1985, Saravia et al., 1987; Rodríguez et al., 1998; Triana et al., 1999; Jaramillo et al., 1999; Ruiz-Garcia et al., 2001; Montilla et al., 2002).

Las técnicas de ITS - RFLP y RAPD han sido utilizadas por otros autores para evaluar la variabilidad de *T. cruzi* (Cupolillo et al., 1995; Fernandes et al., 1999a; Tilley & Hide, 2001; Santos et al., 2002; Cuervo et al., 2002; Tibayrenc et al., 1993; Steindel et al., 1993; Bastrenta et al., 1998; de Castro et al., 1999; Martínez-Díaz et al., 2001; Rodríguez et al., 2002). Sin embargo, Colombia pocos trabajos las han empleado con el fin de caracterizar las poblaciones de este parásito (Cuervo et al., 2002; Rodríguez et al., 2002).

Cuervo et al., (2002), estudió la variabilidad genética de 14 cepas colombianas con la técnica de ITS - RFLP y encontró una alta heterogeneidad entre los aislados. Diez de estos pertenecían a *T. cruzi* I y se agruparon dentro un mismo *cluster* con niveles de similaridad de 0.23 - 0.67. Los niveles de similaridad entre las cepas analizadas en nuestro trabajo, varían entre 0.37 - 0.95 (Anexo G), lo cual contrasta con los resultados anteriores. Sin embargo, estos autores emplearon en su mayoría cepas de *T. cruzi* de origen silvestre, entre las cuales se sabe que existe una elevada heterogeneidad (Saravia et al; 1987; Carrasco et al., 1996). Por el contrario las cepas de este trabajo pertenecen exclusivamente al ciclo domiciliado de transmisión, en el cual se espera una mayor homogeneidad entre los aislados, como ya se anotó anteriormente.

Por otra parte, la técnica de RAPD se ha empleado en numerosos estudios que involucran a *T. cruzi* (Tibayrenc et al., 1993 ; Steindel et al., 1993; Bastrenta et al., 1998; de Castro et al., 1999; Martínez-Díaz et al., 2001; Rodríguez et al., 2002). En Colombia, Rodríguez et al., (2002), utilizaron esta herramienta para caracterizar seis cepas de origen selvático y doméstico de *T. cruzi* I y encontraron una alta heterogeneidad entre ellas. A pesar de que se utilizaron cepas de origen selvático y doméstico aisladas de vectores y humanos, no parece existir una separación entre estos dos últimos grupos. Además, los niveles de similaridad en el análisis de agrupamiento fueron menores de 0.4, mientras nuestro análisis revela niveles entre 0.17 - 0.87. Sin embargo, la desigual procedencia geográfica de los aislados y el escaso número de cepas empleadas pueden explicar estas discrepancias.

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren una diferenciación entre las cepas que infectan a los hospederos invertebrados y a los humanos, dentro del ciclo domiciliado de transmisión de la Enfermedad de Chagas. Las implicaciones epidemiológicas de este hallazgo deberían ser evaluadas en estudios posteriores, que examinen los mecanismos de selección de las poblaciones de *T. cruzi* en ambos hospederos, responsables de estas diferencias. Además se hace necesario la caracterización de un mayor número de aislados

de ambos hospederos, para confirmar la divergencia entre el grupo de vectores y humanos.

Finalmente, el análisis de los ITS y la caracterización con RAPD, son técnicas útiles para evaluar la heterogeneidad de *T. cruzi*, permitiendo incluso detectar diferencias dentro de los principales linajes de este parásito (*T. cruzi* I, II y Z3). Es importante la caracterización de las cepas dentro de las regiones endémicas para la enfermedad de Chagas, con el fin de revelar las características genéticas de los aislados que circulan en estas regiones, lo que contribuirá a esclarecer las relaciones parásito - hospedero y sus asociaciones con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

5. CONCLUSIONES

Existen diferencias genéticas entre las cepas de *T. cruzi* aisladas de vector y aisladas de humano incluidas en este trabajo. Estas observaciones se encuentran en concordancia con algunos estudios realizados y obedecerían a diferentes mecanismos de selección, que ocurren durante el paso de una cepa por los diferentes hospederos vertebrados e invertebrados.

Algunos aislados de vector comparten una mayor semejanza genética con las cepas de humano. Tal similitud podría derivarse de un proceso de homogenización entre los aislados de vector y humano, influenciado por las características ecológicas y geográficas del ciclo domiciliado de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Las técnicas de ITS - RFLP y RAPD son útiles para la caracterización de aislados de *T. cruzi*. Estas herramientas permiten detectar variaciones intraespecíficas entre los diferentes aislados, de importancia para un mejor entendimiento de las características epidemiológicas de los mismos, en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas.

6. RECOMENDACIÓN

Debido a la naturaleza multiclonal de los aislados de *T. cruzi*, se hace necesario separar los diferentes clones que componen cada cepa. De esta forma, los trabajos de caracterización permitirían determinar las características genéticas de los diferentes clones que integran un aislado y que circulan en los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas. Así mismo, con el fin de relacionar los diferentes clones de *T. cruzi*, con las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad, es conveniente realizar trabajos de caracterización que involucren directamente los tejidos infectados con este parásito. Esto con el fin de evitar los mecanismos de selección del hospedero vertebrado y de los medios utilizados para el aislamiento de las cepas.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRADE, Luciana O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 100 (1999); p. 163 - 172.

ANDRADE, Sonia G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 185 -187.

ANDRADE, Zilton A. Immunopathology of Chagas Disease. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 71 - 80.

ANGULO, Víctor Manuel *et al.* Distribución de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) domiciliarios en 26 municipios de Santander, Colombia. En: Memorias Congreso Internacional Investigación y Salud. Biomédica. Suplemento 1. Vol. 17 (1997); p. 162 - 163.

ANGULO, Víctor Manuel *et al.* Nuevos Registros de Triatominos (Hemiptera: Reduviidae) Para el Departamento de Santander y Colombia. En: XXXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. (1998 : Ibagué). Programa y Resúmenes del XXXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Ibagué : Universidad del Tolima, 1998. p. 50.

ANGULO, Víctor Manuel *et al.* Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil. Nodo Nor - Oriental -CINTROP -UIS- (Arauca - Norte de Santander - Santander). En: Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana, Curso - Taller Internacional, Universidad Industrial de Santander. (21 : 1999a : Bucaramanga). Memorias Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga : CINTROP - UIS, 1999a. p. 99 - 108.

ANGULO, Víctor Manuel *et al.* Triatomíneos Domiciliados y Silvestres: Impacto en La Transmisión de la Enfermedad de Chagas en Santander. En: Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana, Curso - Taller Internacional, Universidad Industrial de Santander. (16 : 1999b : Bucaramanga). Memorias Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga : CINTROP - UIS, 1999b. p. 72 - 76.

BASTRENTA, Brigitte and BRENIÈRE, Simone Frédérique. Random by amplified polymorphic DNA analysis of Sylvatic trypanosoma cruzi isolates infers from French Guiana accurate phylogeny. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 93, No. 4 (jul - aug 1998); p. 485 - 486.

BARRETT, Toby Vincet. *et al.* Epidemiological aspects of three Trypanosoma cruzi zymodemes in Bahia State, Brazil. En: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 74 (1980); p. 84 - 90.

BEAVER, Paul Chester; JUNG, Rodney Clifton y CUPP, Eddi Wayne. Parasitología Clínica. Barcelona : Salvat Editores, 1986. p. 100 - 112.

BEHREND, Markus *et al.* Control of Chagas disease in blood banks in Colombia. En: Biomédica. Vol. 22, No. 1 (2002); p. 39 - 45.

BINGDONG, Jiang, *et al.* Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. En: J. Clin. Microbiol. Vol. (2000); p. 241 - 245.

BITTENCOURT, Achiléa Lisboa. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. En: Revista de Patologia Tropical. Suplemento. Vol. 29 (2000); p. 91 - 100.

BLANCK, Andreas *et al.* Activity of Restriction Enzymes in a PCR mix. En: Biochemica. No. 3 (1995); p. 14.

BOSSENO, Marie-France *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in bolivian *Triatoma infestans* shows a high frequency of mixed infections. En: Exp. Parasitol. Vol. 83 (1996); p. 275 - 282.

BOTERO, David y RESTREPO, Marcos. Parasitosis humanas. Medellín : Corporación para investigaciones biológicas, 1998. p. 203 - 227.

BRENIÈRE, Simone Frédérique *et al.* Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: Transmission and circulation in young bolivian patients. En: Exp. Parasitol. Vol. 89 (1998); p. 285 - 295.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes liquid media. En: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Vol. 6 (1964); p. 93 - 100.

CAMPOS, Rozalia F. *et al.* Comparative Analysis by Polymerase Chain Reaction Amplified Minicircles of Kinetoplast DNA of a Stable Strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its Clones and Subclones: Possibility of Predominance of a Principal Clone in this Area. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 94, No.1 (1999); p. 23 - 29.

CARNEIRO, Mariângela *et al.* Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. En: Acta Tropica. Vol. 47 (1990); p. 35 - 45.

CARRANZA, Julio César *et al.* Amplificación por PCR del kDNA y genes del mini - exón para el diagnóstico directo y caracterización de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en vectores domésticos y silvestres en tres regiones endémicas de Colombia. En : XXXIII Congreso

Nacional de Ciencias Biológicas. (1998 : Ibagué). Programa y Resúmenes del XXXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Ibagué : Universidad del Tolima, 1998. p. 58.

CARRASCO, HJ. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 54, No. 4 (1996); p. 418 - 424.

CASTRO, Ana María. Genetic polymorphism among six *trypanosoma cruzi* stocks isolated from chronic chagasic patients. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Vol. 94, No. 5 (1999); p. 655 - 657.

CHAKRABARTI, Raj & SHUTT, Clarence E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. En: Nucleic Acids Research. Vol. 29, No. 11 (2001); p. 2377 - 2381.

CLARK, Graham and PUNG, Oscar. Host especificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 66 (1994); p. 174 - 179.

CORREDOR ARJONA, Augusto. Situación epidemiológica de la Trypanosomiasis Americana en Colombia. En: Situación epidemiológica de la Trypanosomiasis Americana en Colombia (1993 : Bucaramanga). Memorias curso taller nacional de Enfermedad de Chagas. Universidad Industrial de Santander. Bogotá : Ministerio de Salud, 1993. p. 43 - 45.

CUERVO, Patricia *et al.* Genetic diversity of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. En : Mem. Int. Osw. Cruz. Vol. 97, No. 6 (2002); p. 877 - 880.

CUPOLILLO, Elisa *et al.* Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 73 (1995); p. 145 - 155.

DEVERA, Rodolfo; FERNANDES, Octavio and COURA RODRIGUES, José. Should *Trypanosoma cruzi* be Called "cruzi" Complex? A Review of the Parasite Diversity and Potential of Selecting Population after in Vitro Culture and Mice Infection. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 98, No. 1 (2003); p. 1 - 12.

DEVIA, Fany. Caracterización bioquímica de cepas de *Trypanosoma cruzi* del departamento de Santander y otros departamentos. Bogotá, 1999, p. 90. Tesis de grado magíster en microbiología. Universidad de los Andes. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias.

DIAS PINTO, João Carlos e SCHOFIELD, Christopher John. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na *Iniciativa do Cone Sul*. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol 31, No. 4 (jul - ago 1998); p. 373 - 383.

DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology of Chagas Disease [online]. ISBT Brazil, [Sao Paulo, Brazil], 1992 [cited may 14 de 2004]. In: S. Wendel, Z. Brener, M.E. Camargo, A. Rassi. Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. Available from Internet:

<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>

DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiologia. En: BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000a. p. 54 - 55.

DIAS, João Carlos Pinto. Evolución del conocimiento epidemiológico y situación epidemiológica actual. FAC - Federación Argentina de Cardiología. 1er

Congreso virtual de Cardiología [online]. Argentina: 2000b [citado 12 de mayo de 2004]. Conferencias del 1er Congreso Virtual de Cardiología. Disponible en internet: <http://www.fac.org.ar/cvirtual/cvirtesp/cientesp/ecesp/ecc4500c/cpinto/cpinto.htm>.

DON, R.H. *et al.* Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. En: Nucl. Acids Res. Vol. 19, No. 14 (1991); p. 4008.

DUSANIC, D. G. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. En: KREIER, J.P. and BAKER, J.R. Parasitic Protozoa. 6 ed. London : Academic Press, 1991. p. 137 - 194.

FERNANDES, Octavio. *et al.* A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. En: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 95, No. 1 (Jan - Feb 2001); p. 97 - 99.

FERNANDES, Octavio *et al.* Population heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini - exon and ribosomal spacers. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999a); p. 195 - 197.

FERNANDES, Octavio *et al.* The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. En: Parasitology. Vol. 118 (1999b); p. 161 - 166.

FERNANDES, Octavio *et al.* Brazilian Isolates Of *Trypanosoma Cruzi* From Humans and Triatomines Classified Into Two Lineages Using Mini-Exon and Ribosomal RNA Sequences. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 58, No. 6 (1998); p. 807 - 811.

FERREIRA, M.S *et al.* Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. En: Am. J Trop. Me.d Hyg. Vol. 45 (1991); p. 723 - 727.

GARCIA, Eloy S. e de AZAMBUJA, Patricia. Fisiologia de Triatomíneos: Desenvolvimento, Reprodução e Interação com *Trypanosoma cruzi*. En: BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p. 42.

GIBSON, L.J. Pseudogenes and origins. En: *Origins*. Vol. 21, No. 2 (1994); p. 91 - 108.

HARTMANN, Stefanie *et al.* Extensive Ribosomal DNA Genic Variation in the Columnar Cactus *Lophocereus*. En: *J. Mol. Evol.* Vol. 53 (2001); 124 - 134.

HENRIKSSON, Jan.; PETTERSON, Ulf and SOLARI, Aldo. *Trypanosoma cruzi*: Correlation between Karyotype Variability and Isoenzyme Clasification. En: *Exp. Parasitol.* Vol. 77 (1993); p. 334 - 348.

HILLIS, David M.; MORITZ, Craig and MABLE, Barbara K. *Molecular Systematics*. 2 ed. Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, 1996. p. 218 -219.

_____. _____. Sunderland, Massachussets : Sinauer Associates, (1996). p. 232 -234.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (Colombia). Normas para Cultivo *in vitro* de Parásitos de la Familia Trypanosomatidae. Bogotá : INS, 1993. 13p.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. En: *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* Vol. 44 (1908); p. 44 -223.

JACKSON, Colin J.; BARTON, Richard C. and EVANS, E. GLYN. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal - DNA intergenic spacer regions. En: *J. Clin. Microbiol.* Vol. 37 (1999); p. 931 - 936.

JARAMILLO, Nicolás *et al.*. Genetic structure and phylogenetic relationships of Colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 61, No. 6 (1999); p. 986 - 993.

KIRCHHOFF, Louis V. *et al.* American Tripanosomiasis (Chagas Disease). En: Current Treatment Options in infectious Diseases. Vol. 2 (2000); p. 59 - 65.

LAURIA-PIRES, Liana *et al.* Diversity Of *Trypanosoma cruzi* Stocks And Clones Derived From Chagas Disease Patients: I-Behavioral Characterization *In Vitro*. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 30, No. 3 (mai - jun 1997); p. 187 - 192.

LÁZZARI, Julio. Cardiopatía Chagásica Crónica. En: Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana, Curso - Taller Internacional, Universidad Industrial de Santander. (2 : 1999 : Bucaramanga). Memorias Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga : CINTROP - UIS, 1999. p. 5 - 8

LEE, Steven B. and TAYLOR, John W. Phylogeny of Five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. En: Mol. Biol. Evol. Vol. 9, No.4 (1992); p. 636 - 653.

LENT, Herman and WIGODZINSKY, Pedro. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. En: Bull. Mus. Nat. Hist. Vol. 163 (1979); p. 130 - 137.

LIN, T *et al.* Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern united states based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. En: J. Clin. Microbiol. Vol. (2001); p. 2500 - 2507.

LINHARES, Arício Xavier. Vetores do *Trypanosoma cruzi*. En: Revista de Patología Tropical. Suplemento. Vol. 29 (2000); p. 83 - 89.

LUQUETTI, Alejandro *et al.* Trypanosoma cruzi: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. En: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 80, No. 3 (1986); p. 462 - 470.

MACEDO, Andrea M.; OLIVEIRA, Riva P. and PENA, Sergio D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Exp. Rev. Mol. Med. [online], 5 march 2002 [cited 10 may 2004]. Available from internet: <http://www-rmm.cbcu.cam.ac.uk/02004118h.htm>.

MACEDO, Vanize. Indeterminate Form of Chagas Disease. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 311 - 316.

MACEDO, Andrea and PENA, Sergio D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas Disease. En: Parasitol. Today. Vol. 14, No. 3 (1998); p. 119 - 124.

MACEDO, Andrea *et al.* Trypanosoma cruzi: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 99, No. 1 (2004); p. 1 - 12.

MACEDO, Andrea *et al.* DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 55 (1992); p. 147 - 154.

MARTÍNEZ - DÍAZ, Rafael *et al.* Relationship between biological behavior and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* strains. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Vol. 96, No. 2 (2001); p. 251 - 256.

McCULLOUGH, Michael A. *et al.* Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. En: J. Clin. Microbiol. Vol. 36 (1998); p. 1035 - 1038.

MILES, Michael A. *et al.* Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. En: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 74, No. 2 (1980); p. 221 - 237.

MILES, Michael A. *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. En: Nature. Vol. 272 (1978); p. 819 - 21.

MILES, Michael A. *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain - groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. En: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 71, No. 3 (1977); 217 - 225.

MONCAYO, Alvaro. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 3, No. 5 (2003); p. 577 - 591.

MONCAYO, Alvaro. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 401 - 404.

MONTILLA, Marleny. Isoenzyme Clustering of *Trypanosomatidae* Colombian Populations. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 66, No. 4 (2002); p. 394 - 400.

MOREL, Carlos *et al.* Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 77, No.11 (1980); p. 6810 - 6814.

MOREL, Carlos; DEANE, M. and GONÇALVES, Antonio. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. En: Parasitol. Today. Vol. 4 (1986); p. 97 - 101.

NEI, Masatoshi and LI, Wen-Hsiung. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 76 (1979); p. 5269 - 5273.

OLIVEIRA, Riva P. *et al.* Expanded Analysis of 54 Strains Using Eight Polymorphic CA-repeat Microsatellites. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 65 - 70.

OLIVEIRA, Riva P. *et al.* Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95, No. 7 (mar 1998); p. 3776 -3780.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Control de la Enfermedad de Chagas: Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra : OMS, 1991. p. 1. (Serie de informes técnicos de la OMS ; no. 811).

_____ . _____ Ginebra : OMS, 1991. p. 1, 29 - 30. (Serie de informes técnicos de la OMS ; no. 811).

_____ . _____ . Ginebra : OMS, 1991. p. 23. (Serie de informes técnicos de la OMS ; no. 811).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Control de la Enfermedad de Chagas: Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra : OMS, 1991. p. 29. (Serie de informes técnicos de la OMS ; no. 811).

_____ . _____ Ginebra : OMS, 1991. p. 34. (Serie de informes técnicos de la OMS ; no. 811).

PAGE, Roderic D. M. TREEVIEW [Drawing software for Apple Macintosh and Windows]. Ver. 1.6.6. (Glasgow, Scotland): Division of Environmental and Evolutionary Biology Institute of Biomedical and Life Sciences, 2001. Available from internet: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

PAVLICEK, A., HRDA, S., and FLEGR, J. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. En: Folia Biol. Vol. 45, No. 3 (1999); p. 97 - 99.

RASSI, Ani; RASSI, Junior, Ani e RASSI, Gustavo Gabriel. Fase Aguda. En : BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p. 231 - 233.

READY, P.D. and MILES, Michael. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. En: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 74, No. 2 (1979); p. 238 - 242.

REZENDE, Jofre Marcondes and LUQUETTI Alejandro. Chagas Disease and the Nervous System. En: PAHO scientific Publication. No. 547 (1994); p. 160 - 183.

REZENDE, Jofre Marcondes and MOREIRA, Hélio. Forma digestiva da doença de Chagas. En : BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000 p. 297 - 343.

RIVAROLA, Hector *et al.* Modifications in Chagas' Disease Evolution Using Tricyclic Drugs. FAC - Federación Argentina de Cardiología. 1er Congreso virtual de Cardiología [online]. Argentina: 2000 [citado 12 de mayo de 2004]. Conferencias del 1er Congreso Virtual de Cardiología. Disponible en internet:

<http://www.fac.org.ar/scvc/llave/PDF/tl057i.PDF>.

ROCHA, Ademir. *et al.* Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. En: Am. J. Trop. Me. Hyg. Vol. 50 (1994); p. 261 - 268.

RODRÍGUEZ, P *et al.* Variability of 6 Colombian strains of *Trypanosoma cruzi* with restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and random amplification of polymorphic DNA (RAPD). En: Biomédica. Vol. 22, No. 3 (2002); p. 263 - 271.

RODRÍGUEZ, P. *et al.* Isoenzymatic characterization of colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Vol. 93, No. 6 (1998); p. 739 - 740.

ROMANHA, Alvaro J. Aplicações da biologia molecular na doença de Chagas. Utilização do PCR no diagnóstico da doença de Chagas humana. En: Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Suplemento 3. Vol. 25 (1992); p. 27 - 9.

ROMANHA, Alvaro J. *et al.* Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. En: Comp. Biochem. Physiol. Vol. 62B (1979); p. 139 - 42.

ROHLF, F. NTSYS-pc [Numerical taxonomy and multivariate analysis system]. Ver. 2.02j. Exeter Softw. Publ. Ltd. Setanket, New York, USA, 1998.

RUIZ-GARCÍA, Manuel *et al.* Population Genetic Analysis of Colombian *Trypanosoma cruzi* Isolates Revealed by Enzyme Electrophoretic Profiles. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 96, No. 1 (2001); p. 31 - 51.

RUIZ-GARCIA, Manuel. *et al.* Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. En: Heredity. Vol. 85, Pt. 4 (2000); p. 318 - 327.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular cloning. 2 ed. New York : Cold Spring Harbor Labor Press, 1989. p. E3 - E4.

SANCHEZ J. L. *et al.* Aplicación de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico y caracterización de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en reservorios naturalmente infectados en un área endémica del Departamento del Tolima. En: XV Congreso Colombiano de Medicina Interna. Acta Médica Colombiana. Vol. 23, No. 4 (1998); p. 241.

SANTOS, S.S. *et al.* The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3. based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. Ann. Trop. Med. Parasitol. Vol. 96, No. 8 (2002); p. 755 -764.

SCHLÖTTERER, Christian. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. En: Mol. Biol. Evol. Vol. 11, No. 3 (1994); 513 - 522.

SARAVIA, Nancy *et al.* Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 36, No. 1(1987); p. 59 - 69.

SILVEIRA, José Franco. Biología molecular do *Trypanosoma*. En : BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p. 127.

SOKAL, R and SNEATH, P. Principle of numerical taxonomy. San Francisco : Freeman and Company, 1973. p. 537.

SOLARI, Aldo *et al.* Characterization of chilean, bolivian and argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. En: Exp. Parasitol. Vol. 75 (1992); p. 185 - 195.

SOUTO, Ricardo *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 83 (1996); p. 141 - 152.

SOUTO, Ricardo and ZINGALES, Bianca. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 62 (1993); p. 45 - 52.

SOUZA, Wanderley. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. En : BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A. e BARRAL-NETTO, Manoel. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p. 89 - 94.

STEINDEL, Mario *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. En: Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 60 (1993); p, 71 - 80.

STOTHARD, J.R., FRAME, I.A., MILES, M.. Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suplemento 1. Vol. 94 (1999); p. 189 - 93.

TIBAYRENC, Michael and AYALA, Francisco. Towards a population genetics of microorganisms. The clonal theory of parasitic protozoa. En: Parasitol. Today. Vol. 7 (1991); p. 228 - 232.

TIBAYRENC, Michael and AYALA, Francisco. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. En: Evolution. Vol. 42 (1988); p. 277 - 292.

TIBAYRENC, Michael and BRENIÈRE, Simone Frèdèrique. *Trypanosoma cruzi*, major clones rather than principal zymodemes. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Suplemento 1. Vol. 83 (1988); p. 249 - 255.

TIBAYRENC, Michael *et al.* Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in bolivian domestic transmission cycles. En: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol. 80 (1986); p. 442 - 447.

TIBAYRENC, Michael. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random - primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. En: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 90 (1993); p. 1335 - 1339.

TIBAYRENC, Michael. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. En: BAKER, J.R; MULLE, R. and ROLLINSON, D. Advances in Parasitology. London : Academic Press, 1995. p. 47 - 115.

TIBAYRENC, Michael; KIELBERG, Finn and AYALA, Francisco J. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. En: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 87 (1990); p. 2414 - 2418.

TIBAYRENC, Michael. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. En: BAKER, J.R; MULLE, R. and ROLLINSON, D. Advances in Parasitology. London : Academic Press, 1995. p. 47 - 115.

TILLEY, A. and HIDE, G. . Characterization of *Trypanosoma cruzi* brucei stocks using PCR-RFLP analysis of ribosomal internal transcribed spacers (IRT). En: Ann. Trop. Med. Parasitol. Vol. 95, No. 6 (2001); p. 617 - 621.

TRIANA, Omar; JARAMILLO, Nicolás and MORENO, Jaime. Genetic variability of Colombian populations of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. En: Biol. Res. Vol. 32, No.1 (1999); p. 1 - 10.

TURBETT, Gavin and SELLNER, Loryn. Digestion of PCR and RT - PCR products with restriction endonucleases without prior purification or precipitation. En: Promega Notes Magazine. No. 60 (1996); p. 23 - 26.

UMEZAWA, Eufrosina. *et al.* Chagas' disease. En: The Lancet. Vol. 357 (mar 10, 2001); p. 797 - 799.

WILLIAMS, John G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. En: Nucleic Acids Research. Vol. 18, No. 22 (1990); p. 6531 - 6535.

VAGO, Annamaria *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* Strains Obtained Directly from Infected Tissues. En: Am. J. Path. Vol. 149, No. 6 (1996); p. 2153 - 2159.

VAGO, Annamaria *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas Disease. En: Am. J. Path. Vol. 156 (2000); p. 1805 - 1809.

WIDMER, G *et al.* Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. En: Ann. Trop. Med. Parasitol. Vol. 79, No. 3 (1985); p. 253 - 257.

XU, Jianping; VILGALYS, Rytas and MITCHEL, Thomas. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. En: Molecular Ecology. Vol. 9 (2000); p. 1471 - 1481.

ZINGALES, Bianca. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. En: Mem. Inst. Osw. Cruz. Suplemento 1. Vol. 94(1999); p. 159 - 164.

ANEXO A

Medio líquido para cultivo de tripanosomátidos *liver infusion tryptose* (LIT)

Para un litro de medio:

NaCl	4.0 gr
KCl	0.4 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	8.0 gr
Glucosa	2.0 gr
Triptosa	5.0 gr
Extracto de hígado (ref?)	5.0 gr
Hemina (Sigma)	0.025 gr
Suero bovino feta (Invitrogen)	100 ml
Agua destilada estéril	1000 ml

Se disuelven todos los ingredientes excepto el suero bovino fetal y se ajusta el pH a 7.2. Se autoclava durante 15 min a 10 lb de presión. Antes de utilizarlo se le adiciona el suero bovino inactivado a 56°C durante 30 *min.*

ANEXO B

Medio líquido para cultivo de tripanosomátidos REI modificado.

Para un litro de medio:

NaCl	8.0 gr
KCl	0.4 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr
KH ₂ PO ₄	0.06 gr
CaCl ₂	0.07 gr
Glucosa	2.0 gr
NaHCO ₃	1.0 gr
Infusión cerebro corazón (Merck)	10.0 gr
Agua destilada estéril	1000.0 gr

Mezclar bien y ajustar el pH a 7.2. Esterilizar el medio a 15 lb de presión durante 15 *min*. Agregar suero bovino fetal inactivado a 56 °C durante 30 *min*, hasta una concentración final de 2% (v/v).

ANEXO C

Extracción por el método fenol - cloroformo

1. Adicionar un volumen de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico a la muestra
2. Agitar por *inver.* durante un minuto
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 *min*
4. Retirar el sobrenadante y transferir a otro vial
5. Repetir los pasos 1 - 4 dos veces
6. Adicionar un volumen de cloroformo - alcohol - isoamílico 24: 1
7. Repetir los pasos de 1 - 4 dos veces
8. Recuperar el sobrenadante (medir bien el volumen)
9. Adicionar 1/10 del volumen de 3M acetato de sodio pH 5.2
10. Adicionar dos volúmenes de alcohol absoluto
11. Enfriar a -20°C durante 20 *min*
12. Centrifugar durante 20 *min* a 13.000 rpm
13. Eliminar el sobrenadante por *inver.*
14. Mantener los tubos a temperatura ambiente hasta la evaporación del etanol
15. Resuspender en 100 μ l de TE

ANEXO D

Cuantificación del ADN con el método *dot spot*.

1. Construir en una caja de Petri una cuadrícula numerada.
2. Preparar 12 - 15 ml de agarosa al 1% y agregar 1 μ l de bromuro de etidio (1mg/ml).
3. Agregar la agarosa en la caja de Petri y cubrir con papel aluminio hasta que gelifique.
4. Preparar diferentes diluciones de concentración conocida utilizando un marcador de peso molecular comercial y realizar el mismo procedimiento con el ADN de bazo. Depositar en cada cuadro 1 μ l de la dilución, cubrir la caja e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Observar la caja con luz ultravioleta utilizando un transiluminador; se observarán las muestras como círculos concéntricos. Se comparan las diluciones de bazo con las diluciones del patrón de ADN conocido (marcador de peso molecular, mPM) para determinar la concentración aproximada del ADN de bazo (ADNb). A partir de estas concentraciones se cuantifican las muestras de ADN utilizando el mismo procedimiento.

	A	B	C	D	E
1	mPM	dil1	dil2	dil3	dil4
2	ADNb	dil1	dil2	dil3	dil4
3	dil5	dil6	dil7	dil8	dil9
4	dil10	dil11	dil12	dil13	dil14

ANEXO E

Visualización de productos de amplificación sobre geles de poliacrilamida.

Geles poliacrilamida:

Geles poliacrilamida 6% (45 ml):

9 ml TBE 5x

9 ml acrilamida 30%

27 ml agua desionizada

80 µl TEMED

400 µl persulfato de amonio

Coloración con nitrato de plata

Solución Fijadora

40 ml etanol absoluto

4 ml ácido acético

400 ml agua desionizada

Solución plata

0.34 gr nitrato de plata (AgNO_3)

50 ml solución fijadora

100 ml agua desionizada

Solución reveladora

4.5 gr hidróxido de sodio (NaOH)

250 ml agua desionizada

2 ml formaldehído

Sumergir los geles en la solución fijadora durante 5 *min* con agitación; retirar esta solución y agregar la solución de plata agitando suavemente durante 10 *min*. Descartar la solución

de plata y lavar brevemente con agua desionizada; agregar la solución reveladora agitando uniformemente.

ANEXO F

Matriz de presencia - ausencia derivada de los perfiles de ITS - RFLP

	204	319	202	260	209	259	148	132	1227	422I01	126I01	187401	320I01	070I06	743I01	421I01	X10	L.chag
Enzimas																		
Hae1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Hae2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hae3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Hae4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hae5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Hae6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Hae7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hae8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Hae9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Hae10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Hae11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
Hae12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
Hae13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Hae14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Hae15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Hae16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
Hae17?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hae18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Hae19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Hae20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hae21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hae22	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Taq1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Taq2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Taq3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Taq4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Taq5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Taq6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Taq7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
Taq8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Taq9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Taq10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Taq11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Taq12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Taq14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Taq15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Taq16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Taq17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Taq18	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
Taq19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Taq20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Taq21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq24	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Taq25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Taq28	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Bst1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst8	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
Bst9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Bst10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bst11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0

Bst12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Bst13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
Bst14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Bst15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
Bst16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst17	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Bst18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bst19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bst23	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Bst24	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
Bst25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Bst26	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
Bst27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bst28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Rsa1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Rsa2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Rsa3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
Rsa4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Rsa5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Rsa6	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Rsa7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Rsa8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Rsa9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Rsa10	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rsa11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
Rsa13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Rsa14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Rsa15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Rsa16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
Rsa17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0

Rsa18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Rsa19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rsa20	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
Rsa21	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Rsa22	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Rsa23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
Rsa24	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
Rsa25	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Rsa26	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Rsa27	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Rsa28	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Rsa30	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Rsa32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rsa33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Rsa34	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Rsa35	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rsa37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Rsa38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rsa39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rsa40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Rsa41	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Rsa42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rsa43	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
Rsa44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Rsa45	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
Rsa46	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa47	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Rsa48	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rsa49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Rsa50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Rsa51	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0

ANEXO G

Matriz de similaridad generada con el coeficiente de Jaccard, a partir de los datos de ITS - RFLP (NTSYS).

```
"Datos de Claudia Jaramillo
"128 bandas x 17 terminales
" SIMQUAL: input=\\Cintrop-server\Claudia L J\Análisis geles Tesis\Matriz todas
enzimas.(Ntsys).txt, coeff=J
" by Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 18L 18 0
204 319 202 260 209 259 148 132 1227 422I01 126I01 187401 320I01 070I01 743I01
421I01 X10 L.chag
1.0000000
0.6938776 1.0000000
0.6226415 0.7804878 1.0000000
0.8148148 0.7000000 0.6000000 1.0000000
0.7627119 0.6250000 0.5666667 0.8928571 1.0000000
0.7413793 0.6603774 0.5964912 0.8727273 0.9464286 1.0000000
0.7000000 0.8461538 0.6666667 0.7400000 0.6607143 0.6981132 1.0000000
0.6724138 0.6800000 0.6415094 0.7068966 0.7500000 0.7894737 0.7200000
1.0000000
0.5312500 0.4912281 0.4426230 0.5384615 0.5362319 0.4927536 0.4500000
0.4558824 1.0000000
0.5901639 0.5849057 0.4745763 0.5967742 0.5909091 0.5692308 0.6226415
0.6065574 0.5000000 1.0000000
0.6271186 0.5660377 0.5925926 0.5806452 0.5522388 0.5538462 0.5178571
0.5156250 0.4411765 0.5396825 1.0000000
0.6323529 0.4626866 0.4225352 0.5694444 0.5866667 0.5675676 0.4705882
0.5774648 0.5479452 0.6470588 0.5416667 1.0000000
0.5606061 0.4516129 0.4090909 0.5441176 0.5416667 0.5211268 0.5081967
0.5294118 0.4583333 0.5294118 0.5606061 0.7101449 1.0000000
0.6896552 0.5740741 0.5714286 0.6393443 0.6060606 0.6093750 0.5263158
0.5468750 0.4492754 0.5230769 0.8846154 0.5915493 0.5909091 1.0000000
0.5138889 0.4545455 0.4347826 0.5633803 0.6027397 0.5833333 0.4626866
0.5277778 0.5857143 0.5277778 0.4729730 0.6533333 0.5890411 0.5000000
1.0000000
0.4558824 0.4827586 0.4354839 0.4637681 0.5070423 0.5072464 0.4666667
0.5625000 0.5538462 0.5151515 0.3750000 0.6056338 0.5142857 0.4225352
0.5774648 1.0000000
0.2957746 0.3166667 0.3225806 0.3428571 0.3157895 0.3108108 0.2857143
0.2739726 0.4029851 0.2916667 0.3529412 0.3375000 0.3750000 0.3239437
0.4189189 0.3571429 1.0000000
0.1126761 0.1186441 0.1129032 0.1250000 0.1153846 0.1200000 0.0967742
0.0958904 0.1250000 0.1428571 0.0972222 0.1058824 0.0487805 0.1095890
0.1219512 0.0789474 0.0563380 1.0000000
```

ANEXO H

Matriz de presencia - ausencia derivada de los perfiles de RAPD

	204	319	202	260	209	259	132	1227	422I01	126I01	187401	320I01	070I06	743I01	421I01	X10	L.chag
Prim16																	
ban1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
ban2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
ban4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ban5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
ban7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban8	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ban9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
ban11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ban13	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
ban15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ban16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
ban17	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
ban19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
ban21	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ban22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban23	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
ban23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ban24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
ban25	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1

ban26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban27	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
ban28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban31	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
ban32	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
ban33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ban34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
ban35	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
ban36	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban37	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
ban38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban39	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban40	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
ban41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ban42	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
ban43	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ban44	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban46	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
ban49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban52	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
ban53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ban54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ban55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ban56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban57	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
ban58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban59	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0

ban60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
ban61	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ban62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban63	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban64	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
ban65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban66	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ban67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
ban68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ban69	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
ban70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban71	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Prim17																	
ban1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
ban2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
ban3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
ban4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
ban5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
ban6	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
ban8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ban9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ban10	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
ban11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
ban13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
ban14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
ban15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ban16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ban18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
ban19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
ban20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ban22	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
ban23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban24	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban25	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ban26	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
ban28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban29	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ban30	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ban31	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
ban32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban34	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ban35	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ban37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
ban39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ban40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
ban42	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ban43	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
ban44	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
ban45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
ban46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
ban47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ban48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
ban49	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
ban50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ban51	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ban52	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
ban53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ban54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ban55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ban56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

ANEXO I

Matriz de similaridad generada con el coeficiente de Jaccard, a partir de los datos de RAPD (NTSYS).

```
"Datos de Claudia Jaramillo
"126 bandas x 17 terminales
" SIMQUAL: input=\\Cintrop-server\Claudia L J\Análisis geles Tesis\Matriz primer 16 y 17
modif. sin 148. (Ntsys)txt.txt, coeff=J
" by Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 17L 17 0
204 319 202 260 209 259 132 1227 422I01 126I01 187401 320I01 070I01 743I01
421I01 X10 L.chag
1.0000000
0.5675676 1.0000000
0.6578947 0.4750000 1.0000000
0.7812500 0.6060606 0.6111111 1.0000000
0.7941176 0.5833333 0.6315789 0.8666667 1.0000000
0.4705882 0.4375000 0.4166667 0.6071429 0.5312500 1.0000000
0.5405405 0.4722222 0.5675676 0.6250000 0.6000000 0.5000000 1.0000000
0.3958333 0.3125000 0.4166667 0.4090909 0.3750000 0.2500000 0.3478261
1.0000000
0.3090909 0.2363636 0.3272727 0.3137255 0.3148148 0.2000000 0.2884615
0.4528302 1.0000000
0.3777778 0.2888889 0.3404255 0.3255814 0.2978723 0.2820513 0.4250000
0.3673469 0.2203390 1.0000000
0.2833333 0.2166667 0.2580645 0.2631579 0.2666667 0.1607143 0.2631579
0.4137931 0.5263158 0.2222222 1.0000000
0.2586207 0.2105263 0.2982456 0.2830189 0.2631579 0.1730769 0.3076923
0.5000000 0.4821429 0.3773585 0.4193548 1.0000000
0.3750000 0.2439024 0.3333333 0.3888889 0.3500000 0.3030303 0.4285714
0.3043478 0.2500000 0.4473684 0.2500000 0.3469388 1.0000000
0.3061224 0.3043478 0.3000000 0.3409091 0.3125000 0.2380952 0.2553191
0.5333333 0.5416667 0.3061224 0.4629630 0.5000000 0.2666667 1.0000000
0.2068966 0.2222222 0.2456140 0.2264151 0.2105263 0.1836735 0.2264151
0.4423077 0.4545455 0.2500000 0.4655172 0.3965517 0.2352941 0.5319149
1.0000000
0.1777778 0.2250000 0.2000000 0.2000000 0.2093023 0.1714286 0.2307692
0.2083333 0.2115385 0.2045455 0.2592593 0.2075472 0.1794872 0.2222222
0.2448980 1.0000000
0.0303030 0.0847458 0.0298507 0.0327869 0.0468750 0.0370370 0.0862069
0.0579710 0.0263158 0.0793651 0.0506329 0.0675676 0.0338983 0.0144928
0.0857143 0.0535714 1.0000000
```

ANEXO J

Dendrograma generado con *FreeTree*, a partir de los perfiles de RAPD eliminando la banda Rsa18.

