

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Estandarización y detección molecular
de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos
de la Reserva Ecológica “El Zapotal”,
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ELIZA FERNANDA GÓMEZ SÁNCHEZ

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre de 2021





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Estandarización y detección molecular
de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos
de la Reserva Ecológica “El Zapotal”,
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ELIZA FERNANDA GÓMEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR

DR. JOSÉ ANTONIO DE FUENTES VICENTE

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR (LIDiaM)

ASESOR

MTRA. NANCY GABRIELA SANTOS HERNÁNDEZ

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNOSTICO MOLECULAR (LIDiaM)



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre de 2021



Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
Dirección de Servicios Escolares
Departamento de Certificación Escolar
Autorización de impresión



Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 30 de Agosto de 2021

C. Eliza Fernanda Gómez Sánchez

Pasante del Programa Educativo de: Licenciado en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Estandarización y detección molecular de *Trypanosoma cruzi*

en mamíferos de la Reserva Ecológica el Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE



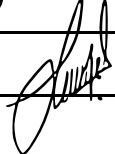
Revisores

Dr. Eduardo Estanislao Espinoza Medinilla

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Firmas:

Ccp. Expediente.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2.1.2 Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.1.3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.1.4 Variaciones Intraespecíficas	7
2.1.5 Linajes	9
2.1.6 Métodos de detección de <i>T. cruzi</i>	9
2.2 Vectores de <i>T. cruzi</i>	12
2.2.1 Clasificación de vectores	13
2.2.2 Morfología de los vectores	14
2.2.3 Ciclo de vida de los triatomíneos.....	15
2.2.4 Vectores en México.....	16
2.3 Reservorios	17
2.4 Enfermedad de Chagas.....	18
2.4.1 Distribución de la enfermedad.....	19
2.4.2 Fases de la enfermedad.....	20
2.4.3 Tratamiento	21
III. ANTECEDENTES	21
IV. OBJETIVOS	24
4.1 General	24
4.2 Particulares	24
V. ZONA DE ESTUDIO	24
5.1 Ubicación y clima	24
5.2 Vegetación.....	25
5.3 Fauna	25
VI. MATERIALES Y MÉTODO.....	26
6.1 Muestreo	26

6.3 Extracción de DNA	27
6.4 Amplificación del Gen mini exón para determinar linaje	29
6.5 Confirmación de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> con sondas taqman ¡Error! Marcador no definido.	
6.6 Prevalencia de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
VII. RESULTADOS	30
7.1 Muestreo	30
7.2 Extracción de DNA	31
7.3 Amplificación del Gen mini exón para determinar linaje y prevalencia de infección por <i>T. cruzi</i>	35
7.4 Amplificaciones con sondas taqman ¡Error! Marcador no definido.	
VIII.DISCUSIÓN	39
IX. CONCLUSIÓN	45
VIII. REFERENCIAS DOCUMENTALES	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Tomado de Toso <i>et al.</i> (2011). ...	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Tomado de: De Fuentes-Vicente <i>et al.</i> (2018).....	7
Figura 3. Distribución de las especies de Triatominos en América. Tomado de: De Fuentes-Vicente <i>et al.</i> (2018).	13
Figura 4: Vista dorsal de un triatomino, mostrando de manera general las partes que forman el cuerpo del insecto principalmente las tres regiones en las que se divide, cabeza, tórax y abdomen. Tomado de: López-Bello (2013).....	15
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Triatoma dimidiata</i> tomado de: De Fuentes-Vicente <i>et al.</i> (2016).....	16
Figura 6. Tres especies de vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> . a) <i>Mecus pallidipenis</i> , b) <i>Triatoma dimidiata</i> , c) <i>Triatoma barberi</i> . Tomado de: De Fuentes-Vicente <i>et al.</i> (2019).	17
Figura 7. Delimitación de la reserva ecológica “El Zapotal”, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tomado de: Palacios <i>et al.</i> (2016)	26
Figura 8. Métodos de extracción y reactivos evaluados en este estudio.....	29
.....	29
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracciones de DNA genómico con método modificado de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi y Martínez (1997). A) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en citrato de sodio al 3.8% pH 7.2. B) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en tubos morados de EDTA. C) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservados en Alcohol etílico al 100%	33
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracciones de DNA genómico con kit de extracción QUICK-DNA™ MINIPREP PLUS KIT. A) Extracción de muestras sanguíneas de mamíferos terrestres del Zoológico Miguel Álvarez de Toro (ZooMAT) conservado en citrato de sodio al 3.8% pH 7.2. B) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en tubos morados de EDTA. C) Extracción	

de muestras sanguíneas de mamíferos terrestres del Zoológico Miguel Álvarez de Toro (ZOOMAT) conservados en Alcohol etílico al 100%. 34

Figura 11. Amplificaciones de PCR multiplex del gen mini exón en gel de agarosa al 1%; L) Marcador de peso molecular escalera de 50pb, Q) Cepa Q TcI 350pb, Y) Cepa Y TcII 300pb. Gel A: tres muestras de quirópteros: 17-19 *Artibeus jamaicensis*. Gel B: tres muestras de mamíferos terrestres: 2,5 y 8 *Didelphis marsupialis*. Las flechas indican la formación de dímeros de primers 36

Figura 12. Detección del linaje TcI utilizando el marcador min exón (Tc y TcII) en mamíferos terrestres silvestres de El Zapotal. L) marcador de peso molecular (escalera) de 50pb, J) control positivo cepa Julieta de 350pb, N) control negativo. Carril 1-6: *Didelphis marsupialis*, Carril 7-10: *Peromyscus mexicanus*, carril 11: *Heteromys desmarestianus* y carril 12: *Dasyprocta mexicana*. 37

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familias y especies de quirópteros capturados 31

Cuadro 2. Familias y especies de mamíferos terrestres capturados 31

Cuadro 3. Rango mínimo de Cantidad de Sangre que se requiere tomar en campo para que los métodos de extracción muestren resultados óptimos 32

Cuadro 4. Especies de mamíferos positivos a la infección por *T. cruzi* del linaje TcI. 38

Cuadro 5. Especies de quirópteros positivos a infección por *T. cruzi* determinado por PCR tiempo real con sondas TaqMan 39

Cuadro 6. Prevalencia de infección por *T. cruzi* en mamíferos silvestres muestreados en la reserva ecológica “El Zapotal” **¡Error! Marcador no definido.**

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad compleja que está presente en todo Sudamérica, Centro América y México (Gulh, 2009) y de acuerdo al Centro Nacional de Programas Preventivos de Control de Enfermedades (CENAPRECE, 2015), en las últimas décadas se han observado casos importados en Estados Unidos, Canadá y países europeos. La enfermedad fue descrita por Carlos Chagas en 1909 en Brasil (Salazar-Schettino *et al.*, 2016) y esta puede llegar a ser mortal y a menudo conduce a lesiones graves en el tejido cardíaco y el tracto digestivo (Camacho-Sierra, 2016). La transmisión de la enfermedad ocurre principalmente por las heces de insectos hematófagos infectados (90 % de los casos) (Martínez *et al.*, 2013), aunque se han registrado también otras formas de infección: transfusional, transplacentaria, por trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio, vía oral o por jeringas infectadas (Apt *et al.*, 2008).

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que esta enfermedad afecta de 7 a 8 millones de individuos y en América Latina se considera en riesgo de infección a un mínimo de 110 millones en 21 países en los que la enfermedad es endémica, incluyendo a México, (Salazar-Schettino *et al.*, 2016; Vidal-Acosta e Ibañez-Bernal, 2000).

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), el cual infecta naturalmente a más de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los órdenes Didelphimorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Perisodactyla y Primates, incluyendo al hombre el cual además de padecer de la enfermedad actúa como reservorio (García-Jordán *et al.*, 2015). *Trypanosoma cruzi* o *T.cruzi* es transmitido por Hemipteros hematófagos de la Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, los ciclos de enfermedades conocidos son el doméstico, peridoméstico y silvestre (Rassi *et al.*, 2010). Debido a la capacidad que tienen algunas especies de triatominos para habitar en las viviendas humanas y alcanzar grandes densidades de población dentro de ellas, el parásito es capaz de circular en ambientes sinantrópicos donde el hombre es el principal reservorio doméstico, seguido por los

perros, gatos y roedores (Cazorla y Nieves, 2010). Se indica que la etiología chagásica se debe a condiciones socioeconómicas y sociales que favorecen su presencia, dichas condiciones siempre asociadas con la pobreza y a viviendas marginadas (Guillén-Ortega *et al.*, 2005). Lo anterior, es debido a la intrusión de viviendas humanas a ambientes selváticos, lo cual fuerza a vectores triatómicos infectados a ocupar viviendas humanas para llevar a cabo la domiciliación de la enfermedad. La magnitud de esta domiciliación no queda clara, pues los estudios sobre la prevalencia de la infección en ciclos silvestres son muy pocos.

En el caso particular del estado de Chiapas, la enfermedad se presenta de manera endémica con una prevalencia estimada en un 12.75 %, con alrededor de 611, 564 personas diagnosticadas con la infección (Camacho-Sierra, 2016), asimismo Velasco-Castrejón y colaboradores (1991) identifican a Chiapas como el estado con la más alta seroprevalencia de *T. cruzi* con 5 % en población abierta y en regiones selváticas existe una prevalencia de 32.1 % (de 355 individuos). En la capital de este estado se encuentra la reserva ecológica “El Zapotal”, la cual alberga alrededor de 23 especies de mamíferos (Fernández-Moreno, 2010) que conviven en sinantropía con viviendas humanas, por lo que juegan un papel importante en la infección peridoméstica de la enfermedad. Históricamente, el parásito *T. cruzi* generalmente ha sido estudiado en su relación con el humano, soslayando el ciclo selvático. En este sentido, la comprobación del movimiento de *T. cruzi* de ambientes silvestres a viviendas humanas y viceversa nos indica la forma en la que hay que abordar la problemática de esta enfermedad y así poder controlar la infección dentro de áreas selváticas para evitar la reintroducción de la infección a ciclos domésticos.

En el presente trabajo se identificó la presencia de infección por *T. cruzi* en mamíferos silvestres de la reserva “El Zapotal”, mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) lo que nos permitió ampliar secuencias de ADN del parásito con alta especialidad y sensibilidad asegurando un diagnóstico certero, al mismo tiempo se trabajó la estandarización de los métodos de obtención, almacenamiento y manejo de muestras biológicas en especies silvestres, para pruebas moleculares.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo flagelado y unicelular del orden kinetoplastida dentro del cual se reconocen varios géneros que incluyen tripanosomas de vida libre (Proleptomas), parásitos exclusivos de invertebrados (Crithidia y Leptomonas), parásitos de plantas e invertebrados (Phytomonas), y parásitos de vertebrados e invertebrados (como los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*) (Bueno-Duarte, 2007).

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes por incluir algunas especies que ocasionan enfermedades en humanos. Tal es el caso de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y *T. gambiense* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño en África (Pereira y Pérez, 2003).

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector de transmisión, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado Stercoraria, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector y las formas infectivas son liberadas con las heces (aquí ubicamos a *T. cruzi* y *T. lewisi*). El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente; en este grupo se encuentran: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli* (Barret *et al.*, 2003).

La clasificación para *T. cruzi* acordada por Levine *et al.* (1980) es:

Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818)

Phylum: Sarcomastigophora (Honigber y Balaniuth, 1963)

Sub-phylum: Mastigophora (Diesind, 1866)

Clase: Zoomastigophorea (Calkins, 1909)

Orden: Kinetoplastida (Honigber, 1963)

Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Género: *Trypanosoma* (Gruby, 1943)

Especie: *Trypanosoma cruzi*

2.1.2 Morfología de *Trypanosoma cruzi*

Los Kinetoplastidos son organismos flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar. Normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto que corresponde a una condensación de ADN (ADNk) localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por todo el cuerpo del parásito, la cual contiene maxicírculos y minicírculos de ADN. Los primeros tienen una longitud perimetral de 30.000 – 50.000 pb (pares de bases) y los segundos de 100 a 2500 pb (Bueno-Duarte, 2007; Camacho-Sierra, 2016).

Palau (1996) menciona que *T. cruzi* tiene un ciclo biológico complejo, debido a que es un organismo digenético con alternancia entre un hospedero vertebrado donde usualmente se encuentra en sangre y tejidos y en el tracto digestivo de un hospedero invertebrado, cambiando su morfología de acuerdo al estadio y lugar donde se encuentra.

Es así que dependiendo del hospedero en que se encuentre *T. cruzi* adopta diferentes formas celulares: epimastigote, tripomastigote y amastigote (Figura 1).

- Epimastigote: Es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino de los triatominos, posee una forma elongada (20 - 40 x 2 μm), y el origen del flagelo próximo y el núcleo por delante. En este estadio solamente se desarrolla en el vector y es una de las formas proliferativas del parásito siendo esta la forma en la que más fácilmente se puede cultivar *in vitro*.
- Tripomastigote: Es la forma extracelular infectiva no posee capacidad replicativa, que se encuentra en la sangre de los mamíferos, en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones. en esta etapa el parásito presenta una forma elongada (20 - 25 μm), con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo y el flagelo emerge por un costado del cuerpo liberándose por el extremo anterior, creando la imagen de una membrana ondulante. En esta forma es cuando ya se puede encontrar en la circulación del mamífero (tripomastigote sanguíneo) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico).
- Amastigote: Con una forma esférica u ovalada (2 - 4 μm), aquí el parásito ya carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el tejido muscular del mamífero. (Camacho-Sierra, 2016).

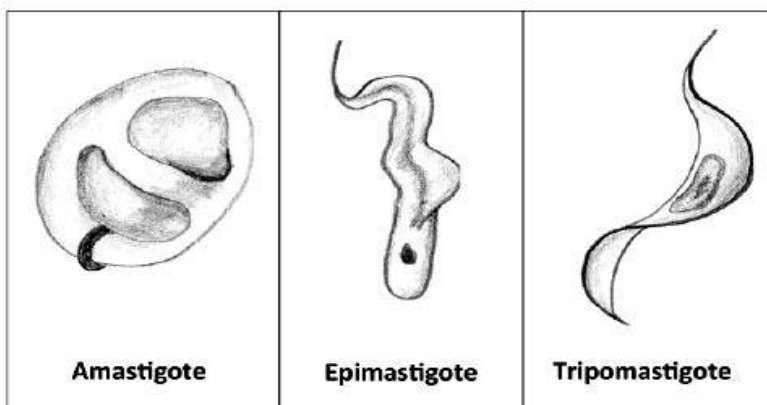


Figura 1. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Toso *et al.* (2011).

2.1.3 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico se inicia cuando el vector o insecto Triatomino (chinche) obtiene sangre de un reservorio vertebrado infectado para alimentarse, en ese momento

ingiere tripomastigotes que se transforman en epimastigotes en el intestino del insecto. Posteriormente, se multiplican por fisión binaria longitudinal y a los 10 días se transforman en tripomastigotes metacíclicos localizados en la porción distal del intestino de la chinche. Cuando el vector ingiere sangre para alimentarse, estos liberan las formas metacíclicas infectivos en las heces. Estas formas infectivas entran al hospedero a través de la herida causada por la picadura o por los tejidos mucosos como la conjuntiva. Una vez dentro del hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células cercanas al sitio de la inoculación (macrófagos u otro tipo de célula) donde se diferencian en amastigotes intracelulares, los cuales se multiplican por fisión binaria cada 10 horas y provocan la lisis de la célula; para entonces transformarse en tripomastigotes que se liberan al torrente sanguíneo. Los ahora tripomastigotes sanguíneos infectan a las células de una gran variedad de tejidos para transformarse nuevamente en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. Como ya se mencionó, los tripomastigotes sanguíneos no se replican (a diferencia de los tripanosomas africanos), la replicación sólo se reanuda cuando los parásitos entran en otra célula o son ingeridos por otro vector. El triatomino se infecta al alimentarse de sangre humana o animal que contienen parásitos sanguíneos. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector estos se multiplican ahí mismo, pasan al intestino grueso y al cabo de quince o treinta días aparecen tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el recto de los triatominos para continuar con el ciclo (Figura 2) (Carrada-Bravo, 2004; Concha, 2015).

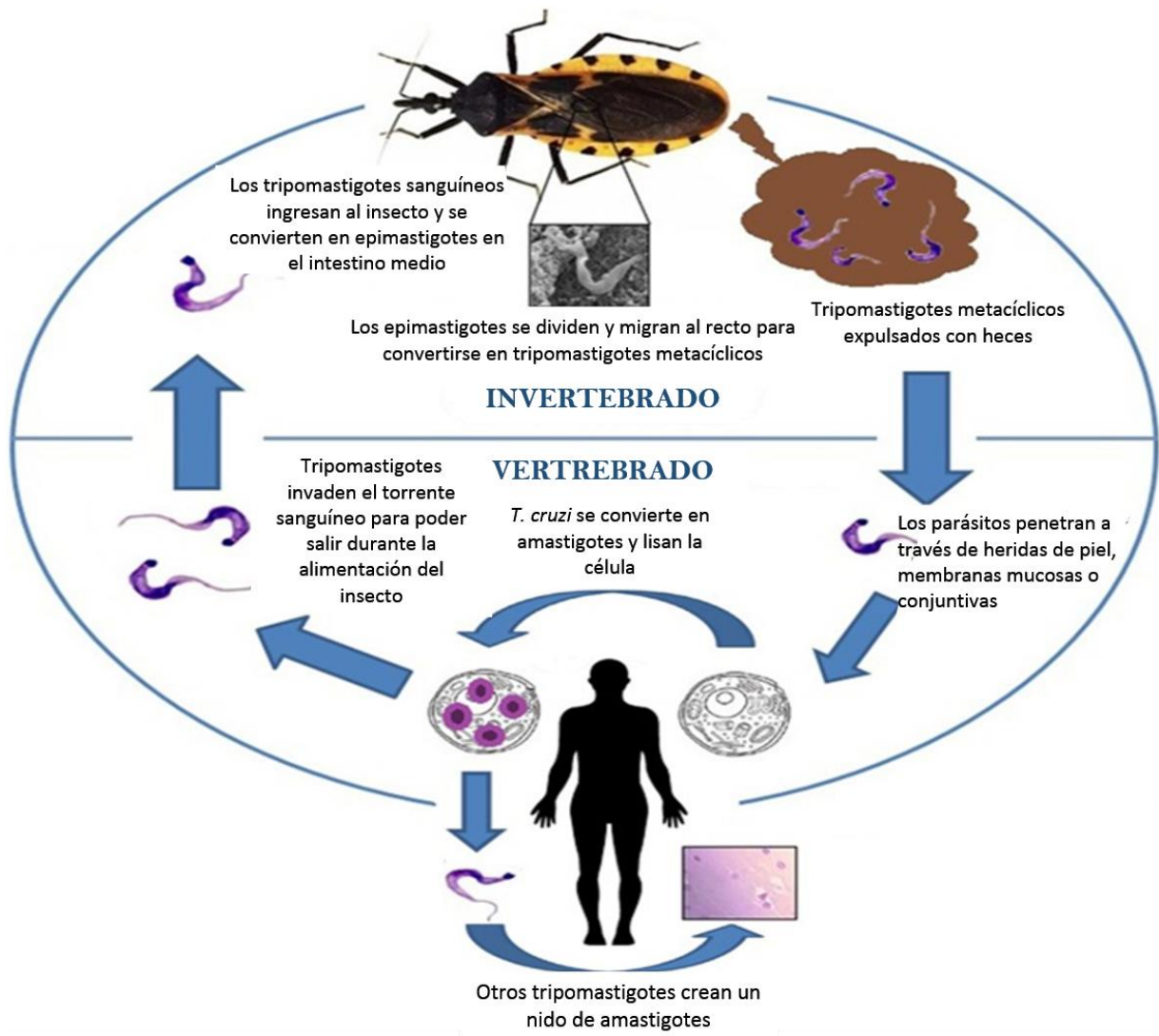


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de: De Fuentes-Vicente *et al.* (2018).

2.1.4 Variaciones Intraespecíficas

Trypanosoma cruzi es un organismo con gran variabilidad intraespecífica en el aspecto bioquímico, inmunológico, genético y biológico (Apt *et al.*, 2008). Actualmente se sabe que *T. cruzi* es una especie heterogénea que consiste en varias subpoblaciones del parásito que circula entre varios vertebrados salvajes, domésticos y huéspedes invertebrados (Devera *et al.*, 2003).

La identificación de variantes se hace bioquímicamente por sus características moleculares. Botero (1998) menciona que mediante estudios isoenzimáticos se diferencian grupos de cepas que conforman zimodemos (poblaciones de *T. cruzi* con

patrones isoenzimáticos comunes). Los principales son Z1, Z2 y Z3, la mayoría de las cepas Z2 han sido aisladas de pacientes con la enfermedad crónica, mientras que las Z1 y Z3 proceden de vectores y reservorios salvajes por lo que se puede evidenciar el comportamiento biológico particular para cada variante. La interpretación genética de los zimogramas de *T. cruzi* ha demostrado que existe una gran variabilidad intraespecífica (Martínez, 1996; Apt *et al.*, 2008).

Como *T. cruzi* está compuesto de poblaciones heterogéneas, el mismo huésped puede infectarse simultáneamente por diferentes cepas. En este sentido, un concepto importante es la clara existencia de clones que son más representativos y se encuentran en varios huéspedes en diferentes áreas geográficas de América Latina. La estructura de población clonal que presenta *T. cruzi* explica la existencia de organismos independientes con características biológicas discretas (Tibayrenc y Ayala, 1991)

Desde principios del siglo pasado se ha postulado que la distribución diferencial de *T. cruzi* en los tejidos puede influir en la patogénesis de la enfermedad. Diferentes estudios han logrado determinar algunas asociaciones epidemiológicas de la enfermedad en las diferentes regiones. Así, mientras las manifestaciones gastrointestinales son raras en Centroamérica, México, Colombia y Venezuela, en Brasil estas manifestaciones tienen mayor incidencia con o sin patología cardíaca asociada. Sin embargo, en estudios recientes se ha podido establecer que las poblaciones multiclonales que infectan un individuo, tienen clones con tropismo específico a diferentes tejidos y es exactamente la distribución de estos clones lo que puede influir o determinar el curso clínico de cada paciente (Mejía y Triana, 2005).

Estudios recientes que utilizan herramientas moleculares demuestran que estos clones principales de áreas endémicas podrían ser responsables de algunas manifestaciones clínicas y respuesta a la quimioterapia. Una hipótesis actual sugiere que la heterogeneidad y la multiclonalidad de una cepa determinan el tropismo tisular diferencial y, en consecuencia, las variaciones en la presentación clínica de la enfermedad (Devera *et al.*, 2003; Mejía y Triana, 2005).

2.1.5 Linajes

Como se pudo detallar anteriormente la diversidad biológica, bioquímica, genética y la complejidad ecoepidemiológica que presenta *T. cruzi* fueron características ampliamente revisadas en distintos lugares. Conforme pasaron los años muchos investigadores utilizaban diversos enfoques para caracterizar la estructura de la población de *T. cruzi* y definir el número de subgrupos, estos subgrupos recibieron designaciones como los ya mencionados; zimodemas, esquizodemas, así como clones, linajes y más recientemente Unidades Discretas de Tipificación por sus siglas en inglés DTU (Zingales *et al.*, 2009; Sánchez, 2018).

La diversidad del genoma de *T. cruzi* y la multiplicidad de sus genotipos y fenotipos es bien conocida, la designación de grupos relevantes de *T. cruzi* desde el punto de vista ecológico y epidemiológico ha oscilado entre unos pocos grupos discretos a muchos (Tibayrenc y Ayala, 1991; Muñoz *et al.*, 2013). En la actualidad, se han asignado seis DTU y en el 2009, éstas se renombraron por consenso de TcI a TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que TcI evolucionó en asociación a los mamíferos marsupiales del género *Didelphis* y TcII, en relación a los mamíferos terrestres, como los armadillos y recientemente se ha descrito un nuevo genotipo muy cercano al linaje TcI designado como Tcbat ligado a murciélagos silvestres (Marcili *et al.*, 2009). A diferencia del origen por propagación clonal para los linajes TcI y TcII, se propone que los otros cuatro DTU's fueron originados como consecuencia de eventos aislados de hibridación y después se realizó la propagación de las clonas (Camacho-Sierra, 2016).

2.1.6 Métodos de detección de *T. cruzi*

El diagnóstico de la presencia de *T. cruzi* puede ser realizado a través de diferentes estrategias, de acuerdo con la fase en la que la enfermedad se encuentra. Ante la sospecha de la infección por *T. cruzi*, se puede recurrir a los medios auxiliares de laboratorio, entre los cuales se destacan: el diagnóstico parasitológico, el inmunológico y el molecular (Garduño-Pineda, 2013).

2.1.6.1 Diagnóstico Parasitológico

El diagnóstico parasitológico se puede establecer en todos los casos agudos (incluyendo las infecciones congénitas) hasta seis semanas después de la infección, pero sólo es posible detectar al parásito en 40% de los casos crónicos, éste a su vez, está dividido de acuerdo al método en: diagnóstico directo e indirecto, presentado una sensibilidad y especificidad de casi el 100 % en algunos casos (Duffy, 2010).

Directo

- **Gota gruesa:** Consiste en la observación microscópica de una gota de sangre fresca sin coagular permitiendo la observación del movimiento del parásito. Es necesaria la examinación de por lo menos 100 campos microscópicos para llegar a la conclusión de la ausencia de los parásitos)
- **Microhematocrito:** Se emplea cuando se realizan exámenes de sangre fresca repetidas y fallan para revelar la evidencia de infección. Consiste en obtener capilares heparinizados con sangre y someterlos a centrifugación. En la interfase entre los hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se observan los movimientos del flagelado con el ayuda del microscopio con ocular de 10 X y objetivo de 40 aumentos.

Indirecto

- **Xenodiagnóstico:** Permite la manipulación de los parásitos. Esta técnica presenta una sensibilidad cercana al 100 % en fase aguda, sin embargo, se reduce a un 60 % si se aplicara en fase crónica y una especificidad del 100 % (un resultado positivo certifica el diagnóstico). Consiste en hacer picar al posible portador del parásito con el vector libre de infección. Es aplicable tanto en la forma clínica aguda y congénita como en la crónica-portador y permite la multiplicación del parásito *in vivo* el cual se detecta examinando las heces del insecto a partir del día 30 de su alimentación (Duffy, 2010).
- **Hemocultivo:** Consiste en cultivar parásitos presentes en muestras de sangre del paciente. Los cultivos son analizados al microscopio a los 20, 30 y 45 días después de la exposición buscando formas epimastigotes. Se siembran varios tubos que se examinan cada mes hasta completar 5 a 6 meses. En la fase

aguda, su sensibilidad puede alcanzar el 100 %. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico.

2.1.6.2 Diagnóstico inmunológico

Las pruebas serológicas por sí solas brindan un diagnóstico presuntivo. Mientras que el diagnóstico de la fase crónica de la infección y exámenes para la selección de donadores de sangre depende esencialmente de resultados serológicos. Estas exámenes requieren mucho tiempo y necesitan personal altamente especializado. Los resultados están disponibles en 1 a 6 meses después de realizado el examen (Concha, 2015).

El diagnóstico serológico se basa en la detección y determinación de anticuerpos (IgG) contra *T. cruzi*, los hay convencionales como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) los denominan así por emplear como antígeno todo el parásito o una mezcla compleja de antígenos del mismo. El diagnóstico serológico no es convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos. En la fase crónica de la infección hay escasez de parásitos en sangre, pero es posible cuantificar altos títulos de anticuerpos dirigidos contra antígenos de *T. cruzi*. A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100 % de sensibilidad y especificidad, de manera que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, por lo menos, 2 técnicas de distinto principio y antígenos diferentes (Flores-Chávez *et al.*, 2007).

2.1.6.3 Diagnóstico molecular

La introducción del estudio de los ácidos nucleicos, permite confirmar la presencia de microorganismos patógenos y de algunos virus de importancia clínica aun cuando el sujeto infectado se encuentre en el “periodo de ventana”, el cual es el período que transcurre entre la infección y la aparición de antígenos o anticuerpos detectables en el organismo desde el punto de vista serológico. Garduño-Pineda (2013) explica que la detección de material genético de regiones conservadas del Kinetoplasto o del genoma del espécimen consiste en extraer ADN de muestras de sangre, heces del vector o de tejidos afectados por el *T. cruzi*. La Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR) es una técnica molecular originalmente desarrollada por Kary Mullis en 1983, mediante la cual se pueden obtener copias *in vitro* de un fragmento de ADN o ARN de forma rápida y económica en pocas horas, es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de cierto ADN específico posibilitando su identificación.

2.2 Vectores de *T. cruzi*

La Organización mundial de la salud por sus siglas en inglés WHO (2002) menciona que *Trypanosoma cruzi* es transmitido a los mamíferos principalmente por los insectos triatominos, en tres ciclos superpuestos: doméstico, peridoméstico y silvestre. Debido a la capacidad que tienen algunas especies de triatominos para habitar en las viviendas humanas y alcanzar grandes densidades de población dentro de ellas, el parásito también circula en los ambientes sinantrópicos (ciclo antropozoonótico, doméstico) siendo el hombre y los animales domésticos los principales reservorios, lo que permite que también ocurra un ciclo peridoméstico (antropozoonótico o intermediario) (García-Jordán *et al.*, 2015).

En el mundo, se han identificado más de 130 especies de vectores que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, con tres géneros de importancia médica que son *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, distribuidos desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile (Figura 3) (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

La relevancia de los triatominos en la salud pública radica en su condición de ser los vectores biológicos de la enfermedad de Chagas en ambientes silvestres y sinantrópicos, donde algunas especies transmiten la enfermedad a los humanos o a los animales domésticos; entre ellos se destacan *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Los triatominos son conocidos como “pitos”, “chinches besadoras”, “barbeiros”, “chupos”, “vinchucas” tanto en América Central y Suramérica, en México se les llama “chinches trompudas” o “chinches besuconas” (López-Bello, 2013; García-Jordán *et al.*, 2015).

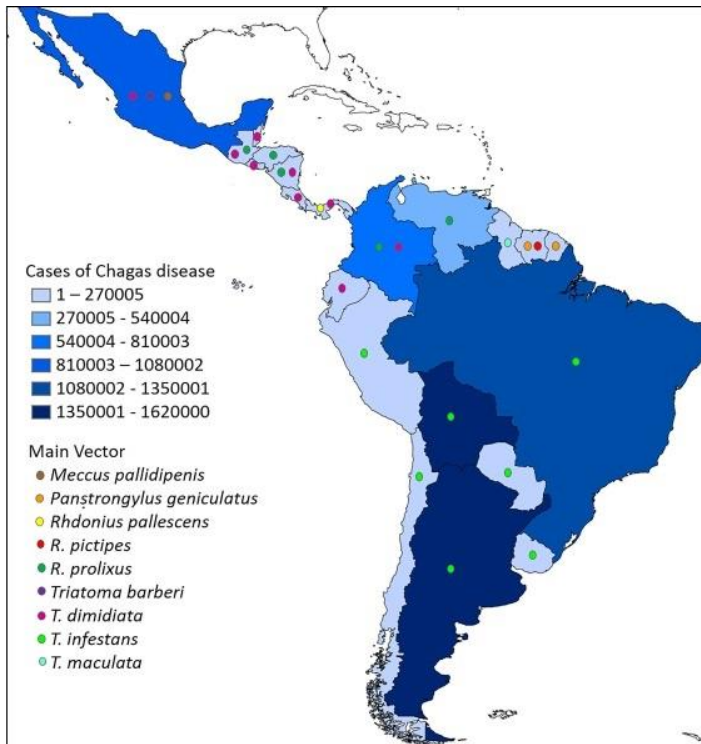


Figura 3. Distribución de las especies de Triatominos en América. Tomado de: De Fuentes-Vicente *et al.* (2018).

2.2.1 Clasificación de vectores

Los triatominos pertenecen al orden Hemiptera, el cual se caracteriza por poseer aparato bucal tipo succionador. La mayoría son organismos que se alimentan de plantas (fitófagos), algunos otros de insectos (depredadores) y unos pocos de sangre de vertebrados (hematófagos). En el suborden Heteróptera se encuentra la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae, única hematófaga en este grupo. De las 149 especies registradas, 111 están restringidas en América y 107 se han informado en infecciones naturales y experimentales con *T. cruzi* (Castillo y Wolff, 2000).

Los triatominos presentan la siguiente ubicación taxonómica (Ruggiero *et al.* 2015)

Reino: Animalia

Infrareino: Protostomia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Superfamilia: Reduvidoidea

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Géneros: *Triatoma*

Dipetalogaster

Rhodnius

Panstrongylus

Eratyrus

Belminus

Paratriatoma

2.2.2 Morfología de los vectores

El tamaño de un triatomino adulto varía entre 1.5 y 3 cm de longitud y su color es variado según las especies. El cuerpo, como todos los demás insectos está dividida en tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. La cabeza es alargada y termina en una probóscide recta segmentada en tres partes que en reposo se dobla centralmente sobre su cuerpo quedando entre el primer par de patas y se extiende para alimentarse. Poseen un par de ojos prominentes, delante de los cuales emerge un par de antenas cuyo punto de implantación es un carácter importante para diferenciar a los géneros de importancia médica (López-Bello, 2013).

El tórax es quitinoso y su segmento anterior tiene forma de escudo (Figura 5) posee un par de alas primarias y un par de alas secundarias más pequeñas, las alas permanecen dobladas sobre el dorso, en general los triatominos son más caminadores que voladores, tienen 2 patas delanteras, 2 patas medias y 2 posteriores. El abdomen puede tener pigmentación de colores vistosos que ayudan en su clasificación. La longevidad del vector es de aproximadamente un año y depende de la capacidad de ayuno, la cual puede ser de hasta varios meses. Una hembra puede poner entre 1200 a 1400 huevos. Tanto los machos como las hembras se alimentan de sangre en cantidad que puede llegar a ser 9 veces su peso es el caso de *T. longipennis* que es uno de los vectores de mayor tamaño del género *Triatoma* (Botero, 1998). Las hembras poseen un aparato ovipositor en la parte posterior del abdomen, el cual los machos no poseen, la cabeza es más larga que ancha, donde contienen dos antenas que les permiten detectar el calor para poder alimentarse.

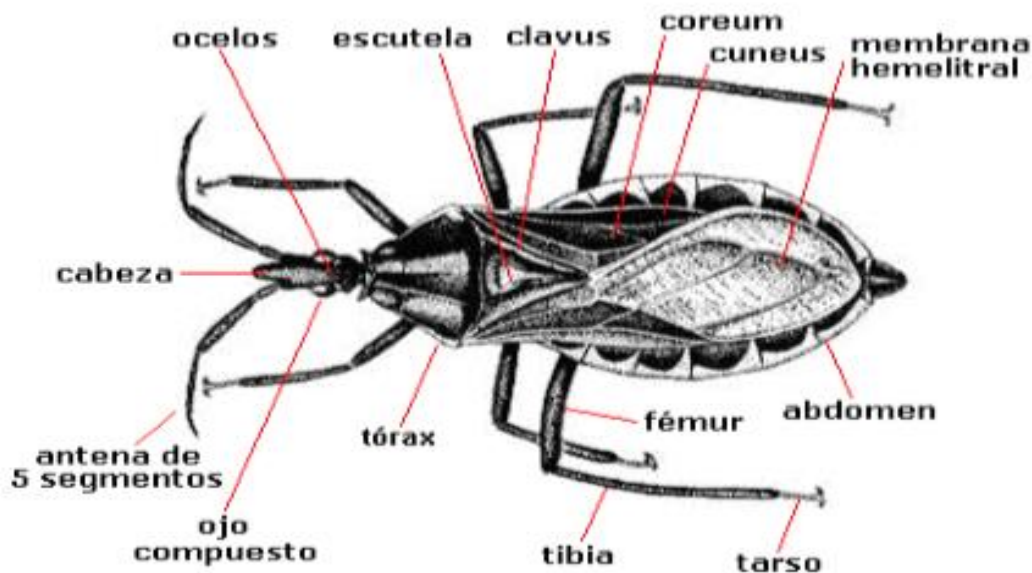


Figura 4: Vista dorsal de un triatominio, mostrando de manera general las partes que forman el cuerpo del insecto principalmente las tres regiones en las que se divide, cabeza, tórax y abdomen. Tomado de: López-Bello (2013).

2.2.3 Ciclo de vida de los triatominos

El ciclo de vida de los triatominos es similar para todas las especies de insectos. Se reproducen a partir de los huevos que la hembra deposita una vez que esta es

fecundada; los huevos miden de 2-3 mm, al inicio tienen un color blanco que cambian a color rosa cuando se completa la evolución del embrión. Desde que sale del huevo hasta su etapa adulta (formas aladas), los triatominos pasan por cinco etapas de crecimiento (estados ninfales), con cambios graduales (mudas) de tamaño y sin alas (Figura 6). López-Bello (2013) especifica que, desde el estado de huevo hasta la etapa adulta, el ciclo evolutivo de los triatominos puede variar de 8 meses hasta un año. A partir de la etapa adulta los triatominos pueden vivir entre 1 y 2 años aproximadamente.

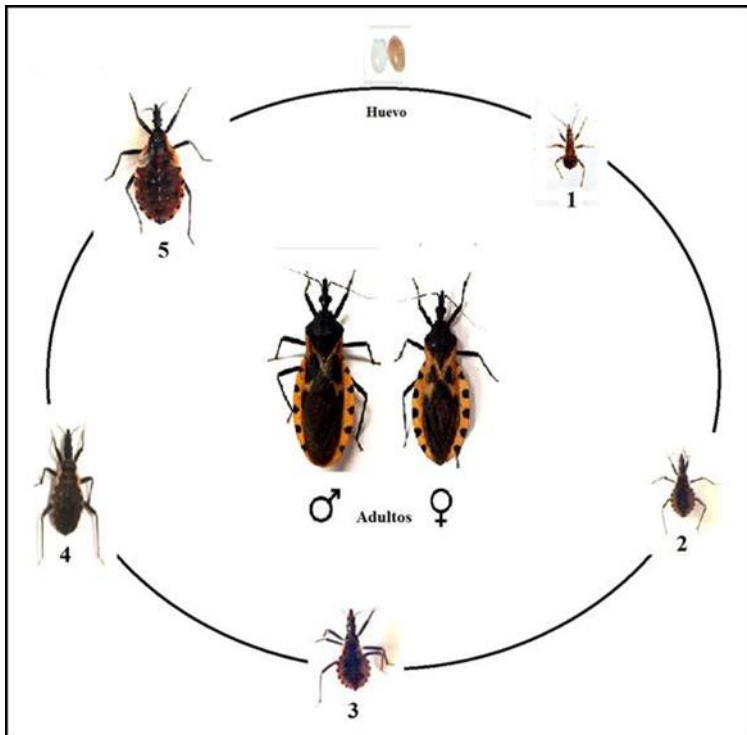


Figura 5. Ciclo de vida de *Triatoma dimidiata* tomado de: De Fuentes-Vicente *et al.* (2016)

2.2.4 Vectores en México

En México, se han identificado un total de 31 especies de triatominos invadiendo casas y con importancia epidemiológica para la transmisión del parásito a humanos, sin embargo, hay 3 especies con mayor importancia para México: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Meccus pllidipenis* (Figura 6). Los vectores triatominos se han urbanizado en la mayoría de las regiones, lo cual demuestra una alta tolerancia a los hábitats modificados por el hombre y los rangos históricos se han ampliado,

exponiéndose más el 88 % de la población mexicana (Salazar-Schettino *et al.*, 2005; Concha, 2015).

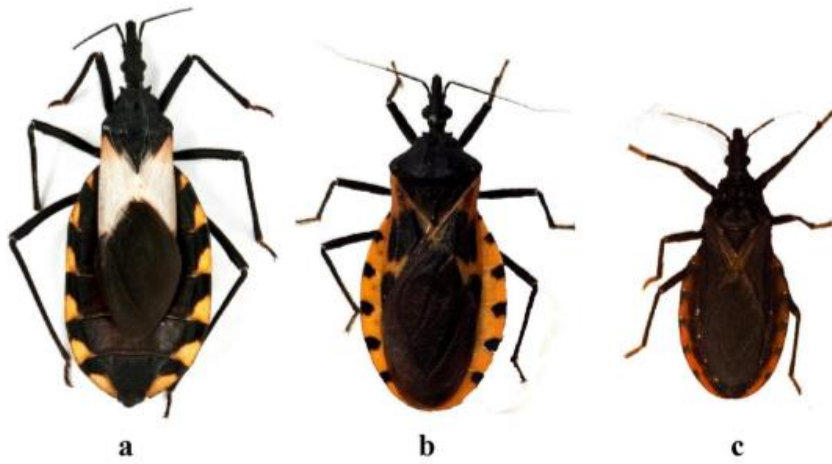


Figura 6. Tres especies de vectores de *Trypanosoma cruzi*. a) *Mecus pallidipennis*, b) *Triatoma dimidiata*, c) *Triatoma barberi*. Tomado de: De Fuentes-Vicente *et al* (2019).

2.3 Reservorios

En su forma primaria esta parasitosis circula en mamíferos silvestres, representantes de los primeros grupos que colonizaron el continente americano tales como marsupiales, desdentados, primates y roedores caviomorfos (Herrera, 2010).

Noireau *et al.* (2009) mencionan que el termino reservorio se refiere en general a especies de mamíferos de vida silvestre que albergan un parásito (se encuentran naturalmente infectados) capaz de infectar a los humanos, recientemente se ha considerado que un huésped que posee un sistema de vida complejo es capaz de sufrir y aplicar presión selectiva según las condiciones de su entorno, jugando así distintos roles en el ciclo de transmisión.

Este protozooario se considera un parásito exitoso por tener la capacidad de mantenerse en la naturaleza por vectores y numerosas especies de mamíferos hospederos distribuidos en casi todos los biomas y hábitats del continente americano. *Trypanosoma cruzi* también puede colonizar casi todos los tejidos en sus muchos huéspedes mamíferos, incluso sitios no convencionales, como las glándulas sudoríparas de marsupiales del género *Didelphis* (Deane *et al.*, 1984).

Aproximadamente 200 especies o subespecies domésticas y de fauna silvestres se han identificado con la infección por *T. cruzi*, desempeñando así el papel de reservorios de la enfermedad (Camacho-Serra, 2016), dichas especies pertenecen a los órdenes: Didelphimorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla (Herrera, 2010; García-Jordan *et al.*, 2015).

Antiguos mamíferos como los marsupiales junto a los Xenarthra (armadillos y osos hormigueros) son considerados los primeros hospederos de *T. cruzi*, y de acuerdo a Deane *et al.* (1984) particularmente los marsupiales de género *Didelphis* debido a su comportamiento sinantrópico y a que pueden mantener infecciones fuertes y altas parasitosis deben considerarse como excelentes reservorios para *T. cruzi* en ambientes peridomésticos, domésticos y perturbados. Diversos estudios han identificado la participación de quirópteros como reservorios salvajes, particularmente las familias: Molossidae, Noctilionidae, Phyllostomidae y Vespertilionidae. Del mismo modo, otros carnívoros, como mapaches (*Procyon lotor*) y zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*) son frecuentemente expuesto a infecciones por *T. cruzi* (Noireau *et al.*, 2009) por lo que se puede suponer algún ciclo de transmisión por carnivoría.

Por otro lado, los anfibios y aves son considerados refractarios a la infección por este parásito, tienen importancia únicamente, por ser fuentes alimentarias en el intra o Peridomicilio (CENAPRECE, 2015).

A pesar de este amplio rango de hospederos, la importancia epidemiológica como reservorios del *T. cruzi* varía según la región geográfica y de acuerdo con la biología y ecología de estos mamíferos y su interacción con triatominos vectores y el hombre (Acosta y López, 2013) esto es en gran medida por las variaciones intraespecíficas antes mencionadas.

2.4 Enfermedad de Chagas

En esta patología se presentan ciclos silvestres sin participación del hombre y ciclos domiciliarios con su participación, los cuales están integrados y son interdependientes (Gulh, 2009).

En el ciclo biológico de *T. cruzi* en la naturaleza, están involucrados el hombre, el vector y un gran número de reservorios mamíferos naturalmente infectados. En el ciclo doméstico participa el hombre, mamíferos domésticos como perros, gatos, ratas, ratones e insectos triatomínicos infectados. En ciclo peridoméstico se considera la unión o el intermedio entre el ciclo doméstico y el silvestre, está integrado por los mamíferos que vienen y van del campo a la vivienda del hombre que puede ser el ganado, además de posibles reservorios silvestres atraídos por alimento o por la luz. En el ciclo silvestre intervienen además de la rata y ratón de campo, la ardilla, marta, zarigüeya tlacuache, armadillo, murciélagos e incluso, primates (Guhl, 2009; CENAPRECE, 2015).

2.4.1 Distribución de la enfermedad

Como se ha mencionado con anterioridad, se estima que esta parasitosis afecta de 7 a 8 millones de individuos; especialmente en América Latina y se considera en riesgo de infección a un mínimo de 110 millones de individuos (20 %) en 21 países: (Figura 4), Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Colombia, Guyana Francesa, Guyana, Surinam, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Belice, Guatemala y México (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

Aunque en México es difícil obtener datos epidemiológicos de la mortalidad por Chagas debido a la falta de experiencia en la elaboración del diagnóstico clínico, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2006, estimó que en México existían aproximadamente 1 100 000 individuos infectados y 29 500 000 en riesgo de contraer la infección, de igual forma, se ha reportado en población abierta prevalencias puntuales de 1 hasta 37 %, la incidencia en 2000 a 2007 se mantuvo en un rango de 0.07 a 0.37 por 100 mil habitantes; a partir de 2008 ascendió de 0.61 a 0.70 por 100 mil habitantes en 2012 (Ramsey, *et al.* 2014; Rojo-Medina, *et al* 2018).

Ramsey y colaboradores (2014) también remarcan que el 57.0 % de la población infectada es residente en zonas rurales y 8.9% en zonas suburbanas y ocho estados (Chiapas, Veracruz, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Michoacán, México, Oaxaca) tienen más del 69 % de los casos seropositivos (931 643 individuos), los cuales representan entre el 5.9 % y el 11.0 % de las poblaciones respectivas en esas entidades.

2.4.2 Fases de la enfermedad

Fase aguda

Generalmente es asintomática y se evidencia una alta parasitemia (Presencia de parásitos en el torrente sanguíneo), con síntomas y signos transitorios, el período de incubación es de 4 a 10 días, este período se extiende por 2 a 4 meses y alrededor del 1 a 2 % de las personas infectadas se pesquisan o son diagnosticadas en esta etapa. De acuerdo al Ministerio de Salud (MINSAL, 2018), los pacientes sintomáticos presentan: fiebre, signos clínicos de la picadura de una chinche, edema, adenopatías satélites, hepatomegalia y esplenomegalia. La lesión inflamatoria, localizada en la puerta de entrada (en una cadena de infección se refiere a la vía que toma el parásito para entra al organismo por ejemplo heridas en la piel), es visible como un chancro de inoculación y se conoce con el nombre de chagoma cuando compromete el párpado constituye el signo de Romaña la tasa de mortalidad en esta fase es baja de 2 % a 7 % (Botero, 1998).

Fase indeterminada

Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período, que va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica, es llamado latente o indeterminado, con una duración media de 10 años. En esta fase el paciente es asintomático y representa un 50 % a 70 % de todas las personas con Chagas un 30 % de estos pacientes mantienen esta forma durante toda su vida. El resto puede evolucionar a una forma crónica determinada en un lapso de 10 a 30 años (CENAPRECE, 2015; MINSAL, 2018).

Fase Crónica

El MINSAL (2018) también especifica que esta fase se manifiesta principalmente como cardiopatía, colopatía y esofagopatía, además frecuentemente compromete otros órganos tales como estómago, duodeno, vejiga, uréteres y otros. Estas formas de presentación pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo enfermo. De acuerdo a Salazar-Schettino y colaboradores (2016) en esta etapa existe una parasitemia baja y fluctuante, con títulos detectables de anticuerpos en pacientes

inmunocompetentes y se estima que alrededor de un 30 % de las personas con Chagas tendrían manifestaciones de la etapa crónica, lo que podría aumentar al emplear métodos diagnósticos más sensibles. En la fase crónica de la cardiopatía es frecuente la muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca congestiva, en estos casos el corazón es pequeño, normal o ligeramente crecido. Otras formas de patología de la enfermedad crónica se relacionan con las lesiones hipertróficas del tubo digestivo o megavísceras, especialmente megaesófago y megacolon, en estos casos existe denervación o destrucción neuronal que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura (Botero, 1998; Rojo-Medina *et al.*, 2018).

2.4.3 Tratamiento

La terapéutica de la enfermedad de Chagas ha constituido un difícil problema, pues por muchos años no existieron drogas para su tratamiento, actualmente hay dos medicamentos activos contra *T. cruzi* para el tratamiento específico de la enfermedad.

Toda persona con Chagas debe ser tratada, a excepción de los enfermos crónicos terminales. Según especificaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1998) cada caso debe ser evaluado con relación al costo beneficio de la terapia antiparasitaria específica, los fármacos tripanomicidas clásicos aprobados hasta ahora para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son: Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ), aunque se han incorporado otras alternativas, como Itraconazol y Alopurinol, en especial en adultos en fase crónica indeterminada y determinada.

III. ANTECEDENTES

En México el papel de los mamíferos silvestres en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* es poco conocido. El descubrimiento de los dos primeros casos oficiales de la enfermedad de Chagas en Oaxaca por Luis Mazzotti en 1940, desencadenó una serie de investigaciones enfocadas en la actividad del parásito y de su vector en la infección humana, años más tarde el descubrimiento del marsupial *Didelphis marsupialis* infectado por *T. cruzi* determina un ciclo selvático o silvestre, y destaca la importancia de comenzar los estudios enfocados a reservorios de dicho ciclo (Velasco-Castrejón y Rivas-Sánchez, 2008).

Es así como, Domínguez *et al.* (1990) Realizan uno de los primeros trabajos de infección por *T. cruzi* en reservorios silvestres en la reserva ecológica el “Zapotal” en Chiapas, donde colectaron 73 individuos de 8 diferentes especies de mamíferos a los cuales les realizaron pruebas xenodiagnósticas, y con el 11 % de positividad determinaron la existencia de un ciclo silvestre de infección mantenido por especies de mamíferos silvestres. En el estado de Yucatán se han llevado a cabo investigaciones de esta índole, en 1996, Zavala-Velázquez y colaboradores realizaron estudios serológicos e histológicos a 372 individuos mamíferos, tanto silvestres como sinantrópicos en donde se obtuvo una alta frecuencia de infección en mamíferos silvestres en comparación con los sinantrópicos y determinaron que mamíferos como *Canis familiaris*, *D. marsupialis*, y *Rattus rattus*, juegan un papel importante en el mantenimiento del ciclo de infección doméstico y su vínculo con el ciclo silvestre

En 1997, nuevamente en la reserva ecológica El Zapotal Solis-Franco y colaboradores colectaron 141 mamíferos de diferentes especies de los cuales 13 resultaron positivos para *T. cruzi*: Dos roedores *Peromyscus mexicanus* y *Heteromys desmarestianus* y un marsupial; *Didelphis virginiana*. Los autores además de corroborar el ciclo infeccioso silvestre en esta zona, indican que la baja tasa de infección en los mamíferos puede ser un reflejo de la baja densidad de vectores Triatomíneos observados en el área y sugieren que la infección se transmite principalmente por canibalismo o necrofagia.

A pesar de los trabajos ya mencionados, actualmente para México, hay poca información reciente que pueda contribuir en el seguimiento del estudio del ciclo silvestre de *T. cruzi*. Dentro de los trabajos recientes se puede citar el realizado en Yucatán por Ruiz-Piña y Cruz-Reyes (2002) en el que, durante dos años, capturaron y recolectaron muestras sanguíneas de *Didelphis virginiana* y obtuvieron el 53.9 % (de 102 individuos capturados) de positividad mediante xenodiagnóstico, además determinaron una alta frecuencia de infección en el periodo comprendido a la estación seca y sugieren una estacionalidad en la infección peridoméstica de *T. cruzi* para esa zona.

Por otro lado, la variabilidad genética que recientemente se ha descubierto en *T. cruzi* crea la necesidad de utilizar nuevos métodos de diagnóstico preciso para determinar la presencia de sus unidades discretas de tipificación DTU (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) (Alonso-Padilla *et al.*, 2017). Es así que, en el año 2008, en Yucatán, Jimenez-Coello y colaboradores pudieron detectar la presencia de tripanosomiasis asintomática en fase aguda en perros de zonas urbanas y rurales mediante la técnica de PCR. Del mismo modo, en el estado de Tabasco Martínez-Hernández *et al* (2014) determinan también por PCR la presencia de la infección en mamíferos semisilvestres: coatí de nariz blanca (*Nasua narica*) y mapache (*Procyon lotor*). Para el estado de Chiapas uno de los trabajos más recientes en el que se incluye el diagnóstico por PCR es el realizado por Camacho-Sierra (2016) en el que realizó la identificación de las unidades discretas de tipificación (DTU's) de *T. cruzi* en marsupiales (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginianus* y *Philander oposum*) presentes en la Reserva Ecológica "El Zapotal", en donde se determinó la presencia del Linaje TcI de *T. cruzi* en 16 de los 60 marsupiales colectados.

Los estudios anteriores se han enfocado principalmente en mamíferos de ámbito terrestre, sin embargo, es importante indicar que recientemente se ha descubierto un nuevo linaje de *T. cruzi* asociado a murciélagos (TcBat) (Marcili, *et al.*, 2009), este hallazgo sugiere que el ciclo de infección silvestre es aún más grande del que se cree y que la migración a un ciclo doméstico es más probable. Tal fue, el caso del primer informe de infección humana por *T. cruzi* atribuido al genotipo TcBat, realizado por Ramírez y colaboradores en el 2013 en una mujer en áreas forestales al noreste de Colombia, en donde las herramientas moleculares determinaron la infección mixta de TcI y TcBat. Por lo tanto es necesario impulsar el estudio de los reservorios silvestres de *T. cruzi* tanto de ámbitos terrestres como los voladores (Murciélagos).

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Estandarizar y determinar la infección por *Trypanosoma cruzi* en mamíferos silvestres medianos y pequeños de la reserva ecológica “El Zapotal” en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

4.2 Particulares

- Evaluar la efectividad de los métodos de extracción de DNA para cepas de *T. cruzi* en muestras de sangre.
- Identificar las especies de mamíferos silvestres capturados en la zona de estudio.
- Evaluar la infección por *T. cruzi* mediante la técnica de PCR en sangre periférica de los mamíferos.
- Determinar el linaje de los parásitos circulantes en la zona mediante marcadores nucleares (mini-exón).

V. ZONA DE ESTUDIO

5.1 Ubicación y clima

La reserva ecológica “El Zapotal” se localiza dos kilómetros al Sureste de Tuxtla Gutiérrez a los 16°43'39" Latitud Norte y 93°06'37" Longitud Oriente. Es un Área Natural Protegida por decreto del gobierno del estado en 1980 (Figura 7). Originalmente cuenta con 100 hectáreas de superficie, más 92 decretadas como zona de amortiguamiento en 1990 (Palacios *et al.*, 2016).

Fisiográficamente es parte de la elevación conocida como Meseta de Copoya, incluida en la Depresión de Chiapas. La geología del lugar corresponde a suelos tipo kárstico lo cual hace que el área tenga un gran número de cavidades y manantiales (Camacho - Sierra, 2016). Su rango altitudinal va desde los 600 hasta los 850 msnm (metros sobre el nivel del mar). El clima de la región de Tuxtla Gutiérrez, corresponde al tipo Cálido Subhúmedo, con lluvias de verano y bajo porcentaje de lluvia invernal

(Aw'' (w)). La precipitación total anual es de 948.2 mm y la temperatura media es de 24.7° C, con vientos dominantes del Norte.

5.2 Vegetación

Predominan dos tipos de vegetación, Selva Mediana Subperennifolia y Selva Baja Caducifolia (Miranda, 2015), también se puede encontrar vegetación secundaria tipo sabana y hay registro de 521 especies vegetales que han sido agrupadas en 359 géneros y 98 familias.

5.3 Fauna

Dentro de la reserva se encuentra el Zoológico Miguel Álvarez del Toro (ZooMAT) que ocupa unas 30 hectáreas. El bosque restante funciona como una pequeña reserva en la que viven libres varias especies de animales tropicales, 154 especies de vertebrados terrestres (10 anfibios, 44 reptiles, 77 aves y 23 mamíferos) entre los cuales se encuentra el mono Saraguato Pardo (*Alouatta palliata*), Guaqueque Negro (*Dasyprocta mexicana*), Ocofaisan (*Crax rubra*), tlacuaches (*Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*), ratón de campo, (*Sigmodon hispidus*), Pavita (*Openelope purpurascens*), armadillo (*Cabassous centralis*), mapache (*Procyon lotor*), ocelote (*Leopardus pardalis*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y alrededor de 24 especies de Quirópteros (Camacho - Sierra, 2016).

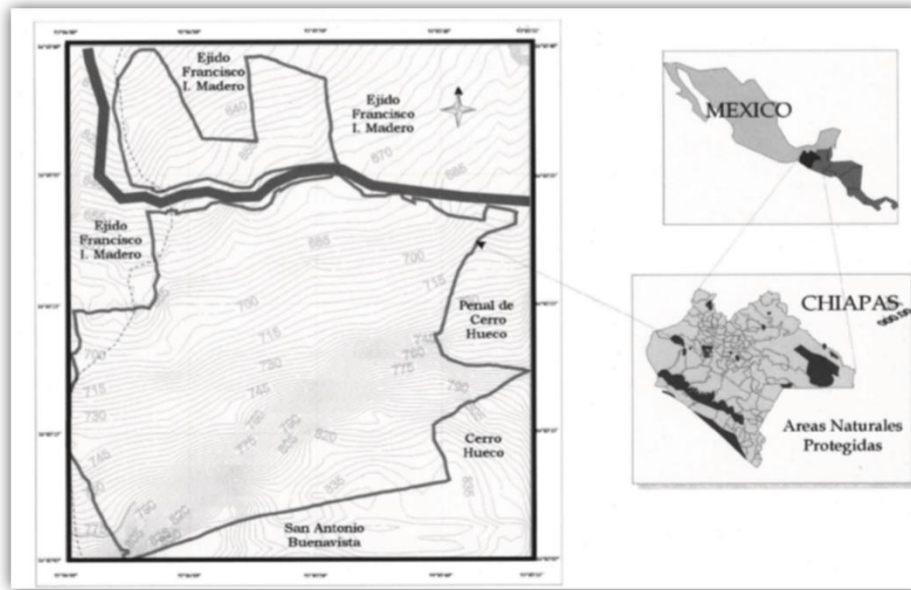


Figura 7. Delimitación de la reserva ecológica “El Zapotal”, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tomado de: Palacios *et al.* (2016)

VI. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Muestreo

Se realizaron muestreos dentro de la reserva ecológica “El Zapotal” ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, en las siguientes ubicaciones $16^{\circ}43'22.6'$ N', $93^{\circ}05'44.1'$ W y $16^{\circ}43'18.1'$ N $93^{\circ}05'21.9'$ W. Los muestreos se llevaron a cabo en los meses de enero 2020 a marzo de 2021. Las zonas de muestreo se seleccionaron al azar dando preferencia a zonas cercanas a cuerpos de agua y árboles frutales grandes. Para la captura de los mamíferos terrestre se hizo uso de 20 trampas tipo Tomahawk para mamíferos medianos (de tamaño menor a 1 o 2 kg) y 15 trampas Sherman para mamíferos pequeños (Romero-Almaraz *et al.*, 2000) utilizando como cebo una mezcla de avena/extracto de vainilla con un esfuerzo de muestreo de 8 horas/ trampa.

Para la captura de quirópteros se utilizó la técnica con “Red de Niebla” (Medellín, *et al.*, 2008) colocando 3 redes cerca de cuerpos de agua y de árboles frutales grandes con un esfuerzo de muestreo de 8 horas/red, tanto las redes como las trampas se colocaron una vez comenzó el atardecer, alrededor de las 5pm. El manejo de los

mamíferos colectados fue con guantes de carnaza para evitar mordeduras. Con ayuda de un GPS de mano se determinaron las coordenadas de los sitios de captura de los mamíferos.

Los quirópteros se identificaron taxonómicamente utilizando la clave especializada de Medellín *et al* (2008) y para el caso de mamíferos terrestres se hizo uso de la guía de mamíferos de Reid (2009).

6.2 Toma de muestras

Las muestras consistieron de extracciones sanguíneas de los ejemplares capturados como especifica Romero-Almaraz *et al.* (2000). En mamíferos terrestres la sangre se obtuvo por medio de una pequeña incisión en la cola y para murciélagos se obtuvo directamente por punción intracardiaca con ayuda de jeringas para insulina U-100 1ml 31Gx6MM. Las muestras obtenidas fueron etiquetadas conforme los individuos fueron capturados; Quiróptero (Qn), Roedores (Rn), Marsupiales (Mn), donde n representa el número consecutivo del individuo capturado.

Se evaluaron 3 diferentes buffers de almacenamiento para conservar las muestras sanguíneas (Figura 8); con alcohol etílico al 100% (0.5ml en tubos para microcentrífuga), citrato de sodio al 3.8% pH 7.2 (0.5ml en tubos para microcentrífuga) y en EDTA en tubos morados BD Vacutainer®, la eficiencia de estos reactivos se determinó de acuerdo a los resultados de las extracción de DNA en las visualizaciones en gel de agarosa, las muestras tomadas en campo fueron trasladadas inmediatamente al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LiDIAM) en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y fueron conservadas en refrigeración a -4°C.

6.3 Extracción de DNA

Se realizó el trabajo de estandarización del método de extracción de DNA para muestras sanguíneas de quirópteros y mamíferos terrestres. Se probaron dos métodos diferentes de extracción de DNA para los diferentes buffers de almacenamiento probados en la conservación de muestras sanguíneas (Figura 8); Mediante el método modificado de extracción con sales de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi y Martínez

(1997) y el método con kit de extracción QUICK-DNA™ MINIPREP PLUS KIT, el primero consiste en un método universalmente aplicable de extracción con sales de DNA genómico de diferentes organismos, para este método la cantidad de sangre requerida fue de aproximadamente 30 µl (dependiendo de la cantidad de muestra sanguínea obtenida en campo, varía entre 15-30 µl), a las muestras se agregaron 300 µl de Buffer TEN + SDS 2% (0.4 M NaCl, 10 Mm Tris- HCl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0 y 40 µl de 20% de SDS) frío y 10 µl de proteinasa y se dejó incubar por 24 horas a 56° C. Pasado este tiempo se agregaron 100 µl de NaCl 5M y se centrifugó a 14 000 rpm a 4° C (cuando el sobrenadante aún estaba muy turbio, se agregaban 100 µl más de NaCl 5M y se volvía a centrifugar), al sobrenadante en tubos nuevos se le agregaron 800 µl de etanol al 100 % (alcohol absoluto a -20°C, si el sobrenadante obtenido era insuficiente se agregaban 600µl de etanol). Las muestras se dejaron toda la noche a -20° C. Nuevamente se centrifugaron y se desechó el sobrenadante para obtener un pellet al cual se añadieron 800 µl de etanol al 70 % frío (-20°C) nuevamente se centrifugó y se desechó el sobrenadante y se dejó evaporar toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secas las muestras se añadieron 100 µl de agua destilada estéril para hidratar el DNA (150 µl si el pellet no estaba completamente limpio) y se conservó a -20°C para uso posterior.

El segundo método consiste en el aislamiento fácil y rápido de DNA (Por ejemplo DNA genómico, mitocondrial y viral). De una variedad de fuentes de muestras biológicas, este kit incluye columnas Zymo-Spin que permiten la purificación de DNA de alta calidad en minutos, para este método se necesitaron 20 µl de muestra sanguínea (dependiendo de la cantidad de muestra sanguínea obtenida en campo, podría variar entre 10-25 µl). Las extracciones fueron visualizadas en gel de agarosa al 1% y de acuerdo a estos resultados se determinó el método más eficiente.

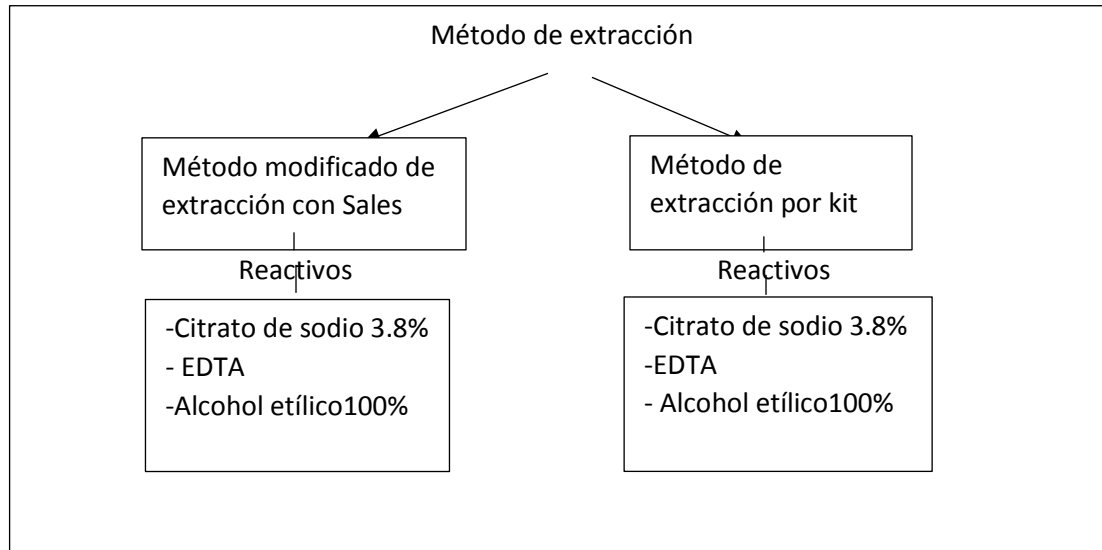


Figura 8. Métodos de extracción y reactivos evaluados en este estudio.

6.4 Amplificación del Gen mini exón para determinar linaje

El DNA extraído se amplificó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR punto final múltiple usando tres oligonucleótidos reportados por Fernández *et al.* (1998) y Mejía y Triana (2005) que amplifica un espaciador intergénico de los genes mini exón de *Trypanosoma cruzi*; Tc (5´CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG´3), TcI que amplifica un fragmento de 350pb (5´GTG TCC GCC ACA ACC TCC TTC GGG CC´3) y TcII que amplifica un fragmento 300pb (5´CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGTG´3). Como controles positivos se usaron dos cepas Cepa Q (TcI procedente de Querétaro) con 350 pb y Cepa Y (TcII cepa de referencia aislada en Brasil) con 300 pb. Las condiciones de amplificación fueron, 4:30 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 61°C, 1 minuto a 72°C y 5 minutos a 72°C. Además se realizó dos PCR más con las mismas condiciones utilizando los oligonucleótidos por separado, es decir se utilizó Tc y TcI para determinar la presencia del linaje *T. cruzi* II y los oligonucleótidos Tc y TcII para determinar presencia la presencia del linaje *T. cruzi* I. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro etidio y se hizo uso del marcador DNA Ladder Invitrogen™ de 50 pb.

6.6 Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi*

De acuerdo a los resultados obtenidos con la amplificación del gen miniexón, se determinó la prevalencia de infección en mamíferos silvestres mediante el porcentaje de individuos infectados con relación al total de los mamíferos silvestres muestreados dentro de la Reserva Ecológica “El Zapotal”.

VII. RESULTADOS

7.1 Muestreo

En total se capturaron 152 mamíferos tanto terrestres como voladores; 110 fueron quirópteros de once especies diferentes (cuadro 1), ocho especies pertenecen a la familia Phyllostomidae y tres especies a la familia Mormopidae, Dentro de los filostomidos 5 especies son del tipo de alimentación principalmente frutivora (*Artibeus jamaicensis*, *Artibeus lituratus*, *Sturnira lillium*, *Centurio senex* y *Carollia perpsillata*), dos especies son nectivoras (*Leptonycteris yerbabuenae* y *Glossophaga soricina*) y sólo una especie es hematófaga (*Desmodus rotundus*).

Los mamíferos terrestres capturados fueron en total 42 individuos pertenecientes a cuatro especies y familias diferentes (Cuadro 2), *Didelphis marsupialis* (Didelphimorfia: Didelphidae) conocido como “Tlacuache”, *Dasyprocta mexicana* (Rodentia: Dasyproctidae) conocido como “Guaqueque”, el ratón silvestre mexicano *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Cricetidae) y el ratón de abazones *Heteromys desmarestianus* (Rodentia: Heteromyidae). Los roedores pueden incluir en su dieta una gran variedad de tallos frutos, semillas y algunos incluyen también a los artrópodos, los didelfidos son omnívoros oportunistas que pueden alimentarse de insectos, lombrices y pequeños vertebrados, puede consumir también semillas, frutos y néctar.

Cuadro 1. Familias y especies de quirópteros capturados

Familia	Especie	No Individuos
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	64
	<i>Artibeus lituratus</i>	16
	<i>Sturnira lillium</i>	3
	<i>Centurio senex</i>	2
	<i>Leptonycteris yebabuenae</i>	2
	<i>Carollia perpscillata</i>	7
	<i>Desmodus rotundus</i>	2
	<i>Glossophaga soricina</i>	8
Mormoopidae	<i>Pteronotus Davyi</i>	1
	<i>Pteronotus parnelli</i>	3
	<i>Mormoops megallophyla</i>	2
Total	110	

Cuadro 2. Familias y especies de mamíferos terrestres capturados

Familia	Especie	No. de individuos
Didelphidae	<i>Didelphis marsupialis</i>	18
Cricetidae	<i>Peromyscus mexicanus</i>	7
Heteromyidae	<i>Heteromys desmarestianus</i>	10
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta mexicana</i>	7

7.2 Extracción de DNA

Las extracciones exitosas de DNA obtenidas por ambos métodos dependieron de la cantidad de muestra sanguínea conseguida en campo. En función de poder estandarizar un método que asegure la poca perturbación de los organismos muestreados se pudo determinar la cantidad mínima de sangre colectada en campo con las que se obtuvieron extracciones de DNA exitosos, siendo el Citrato de sodio y el EDTA los anticoagulantes que requirieron menos sangre para que se visualizaran bandas de extracción para ambos métodos (Cuadro 3).

Las mejores bandas de DNA genómico obtenidas con el método modificado de extracción con sales de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi y Martínez (1997) (Figura 9) fueron con las muestras almacenadas en alcohol etílico al 100%, sin embargo estas bandas se obtuvieron en las muestras que tenían más de 0.25 ml de sangre. Por otro lado, con éste mismo método usando citrato sodio 3.8 % las mejores bandas de DNA genómico se obtuvieron con muestras con menos cantidad de sangre (0.5 - 0.6 ml) las mejores bandas en muestras en EDTA se mostraron con muestras con mayor cantidad de sangre (0.9 - 0.1 ml)

Las extracciones realizadas con el Kit de extracción QUICK-DNA™ MINIPREP PLUS KIT (Figura 10) muestran bandas de extracción de DNA genómico bien definidas con los tres buffers de almacenamiento usados. La extracción con kit de muestras en alcohol etílico al 100% tiene bandas muy bien definidas y para lograrlo se necesitó menor cantidad de muestra sanguínea tomada en campo (con respecto a los demás reactivos), por otro lado las extracciones con citrato de sodio también muestran bandas bien definidas y la cantidad mínima requerida de sangre tomada en campo también es baja, aunque las bandas de extracción con EDTA se ven claramente la cantidad mínima requerida es alta por lo que no se puede asegurar la poca perturbación de las especies silvestres.

Cuadro 3. Rango mínimo de Cantidad de Sangre que se requiere tomar en campo para que los métodos de extracción muestren resultados óptimos

Buffer de almacenamiento	Método modificado de extracción con sales de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi y Martínez (1997)	Kit QUICK-DNA™
CITRATO DE SODIO 3.8%	0.05-0.06 ml (1-2 unidades)	0.01-0.02 ml (1-2 unidades)
EDTA	0.09-0.1 ml (9-10 unidades)	0.06-0.1 ml (6-10 unidades)
ALCOHOL 100%	0.25-0.30 ml (25-30 unidades)	0.01-0.015 ml (1-1.5 unidades)

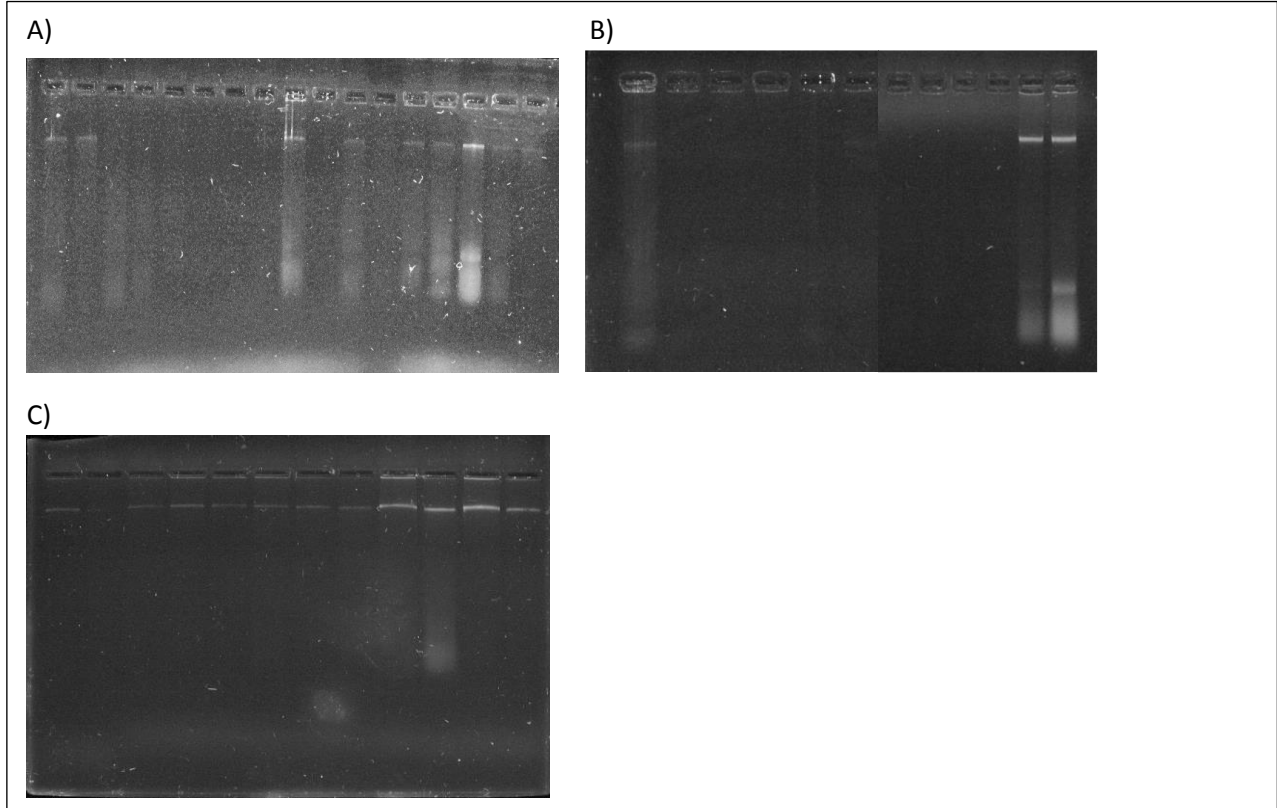


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracciones de DNA genómico con método modificado de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi y Martínez (1997). A) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en citrato de sodio al 3.8% pH 7.2. B) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en tubos morados de EDTA. C) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservados en Alcohol etílico al 100%

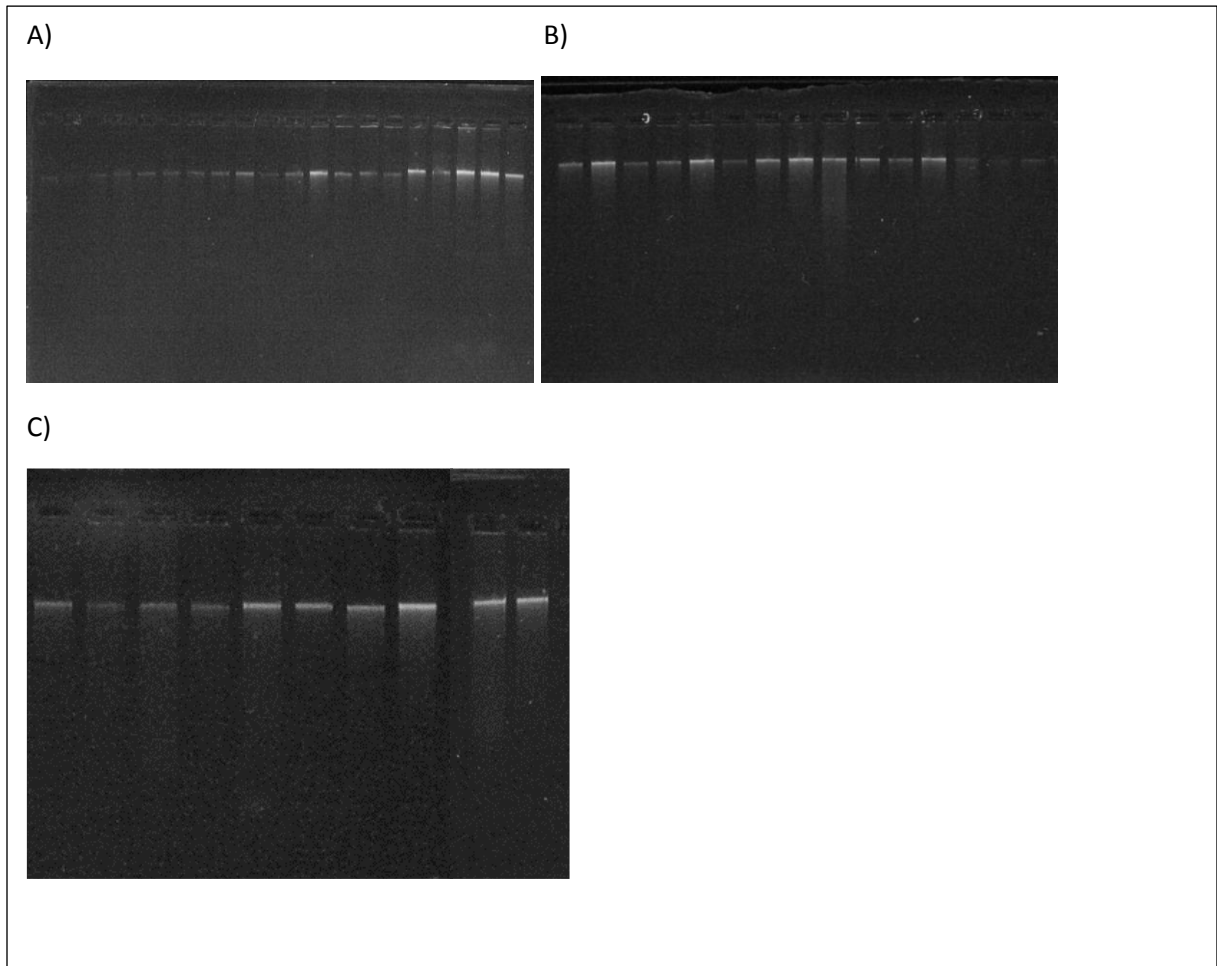


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracciones de DNA genómico con kit de extracción QUICK-DNA™ MINIPREP PLUS KIT. A) Extracción de muestras sanguíneas de mamíferos terrestres del Zoológico Miguel Álvarez de Toro (ZooMAT) conservado en citrato de sodio al 3.8% pH 7.2. B) Extracción de muestras sanguíneas de murciélagos conservado en tubos morados de EDTA. C) Extracción de muestras sanguíneas de mamíferos terrestres del Zoológico Miguel Álvarez de Toro (ZOOMAT) conservados en Alcohol etílico al 100%.

7.3 Amplificación del Gen mini exón para determinar linaje y prevalencia de infección por *T. cruzi*

Todas las muestras amplificadas con PCR punto final múltiple usando los tres oligonucleótidos ya mencionados para amplificar una región intergénica de los genes mini exón de *T. cruzi* no mostraban ninguna ampliación tanto para murciélagos como para mamíferos terrestres, en la Figura 11 se puede observar una parte de las ampliaciones hechas en donde sólo los controles positivos cepa Q (TcI de 350pb) y cepa Y (TcII de 300pb) muestran ampliaciones, además se pueden observar los llamados “dímeros de primer”, característico de una auto complementariedad de los oligonucleótidos usados.

La PCR con los oligonucleótidos Tc y TcI no mostró ningún amplicon excepto por el control positivo por lo que se descarta infección por *T. cruzi* del linaje TcII en mamíferos terrestres. Por otro lado la PCR con los oligonucleótidos Tc y TcII mostró amplicones con un tamaño de 350pb correspondiente al grupo o linaje TcI (Figura 12), por lo tanto se determinó infección por *T. cruzi* del Linaje TcI en 12 mamíferos terrestres (28.57%) de las 4 especies encontradas (Cuadro 4); *Didephis marsupialis* (6/18, 33.33%), *Peromyscus mexicanus* (4/7, 54.14%), *Heteromys desmarestianus* (1/10, 10%), *Dasyprocta mexicana* (1/7, 14.2%). En el caso del grupo de quirópteros, 18 (16.36%) mostraron amplicones con el tamaño correspondiente al linaje TcI (Figura 13) estos corresponden a cinco especies; *Artibeus jamaicensis* (10/64, 15.62%), *Artibeus lituratus* (3/16, 18.75%), *Carollia perspicillata* (2/7, 28.57%), *Glossophaga soricina* (1/8, 12.5%) *Sturnira lilium* (2/3, 66.66%) (Cuadro 5).

Se determinó una prevalencia de infección por *T. cruzi* del 28.57% en mamíferos terrestres, una prevalencia del 16.36% en quirópteros y una prevalencia del 19.73% del total de la fauna silvestre muestreada (152 individuos) en la Reserva ecológica El Zapotal (Cuadro 6).

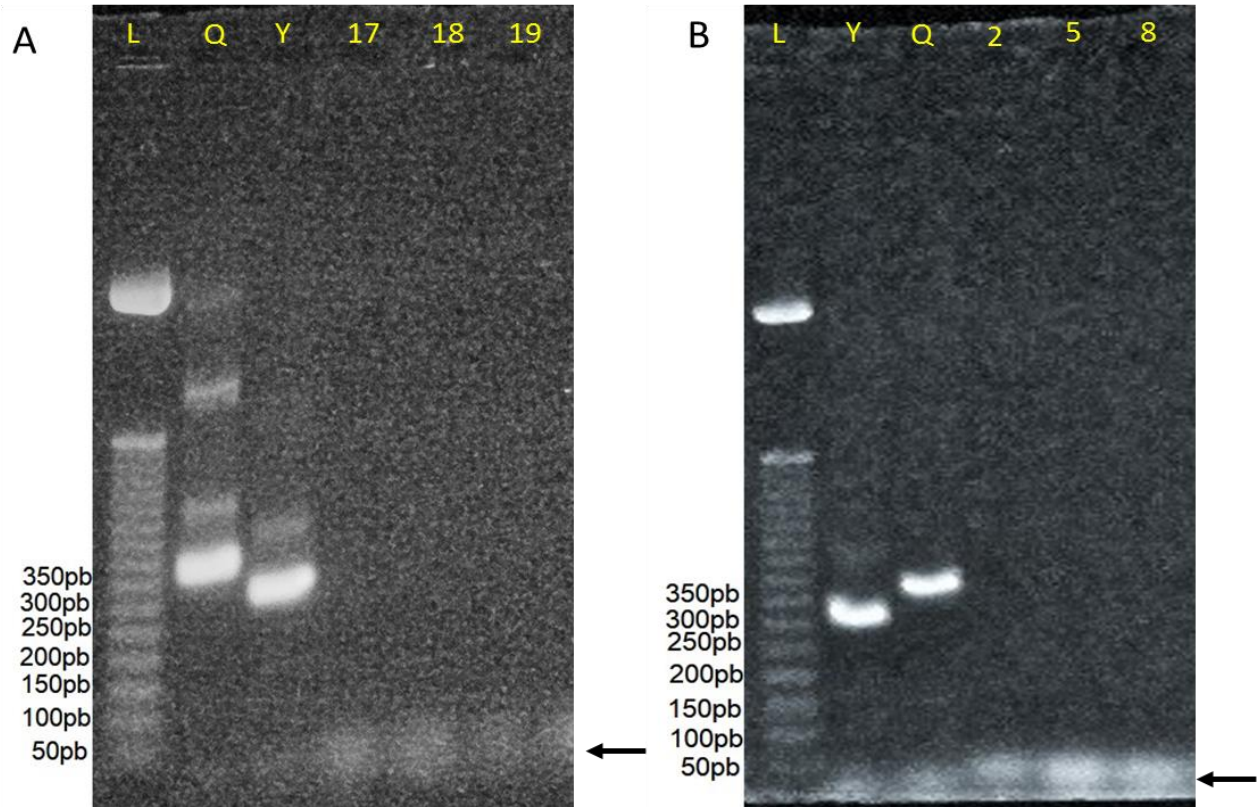


Figura 11. Amplificaciones de PCR multiplex del gen mini exón en gel de agarosa al 1%; L) Marcador de peso molecular escalera de 50pb, Q) Cepa Q TcI 350pb, Y) Cepa Y TcII 300pb. Gel A: tres muestras de quirópteros: 17-19 *Artibeus jamaicensis*. Gel B: tres muestras de mamíferos terrestres: 2,5 y 8 *Didelphis marsupialis*. Las flechas indican la formación de dímeros de primers.

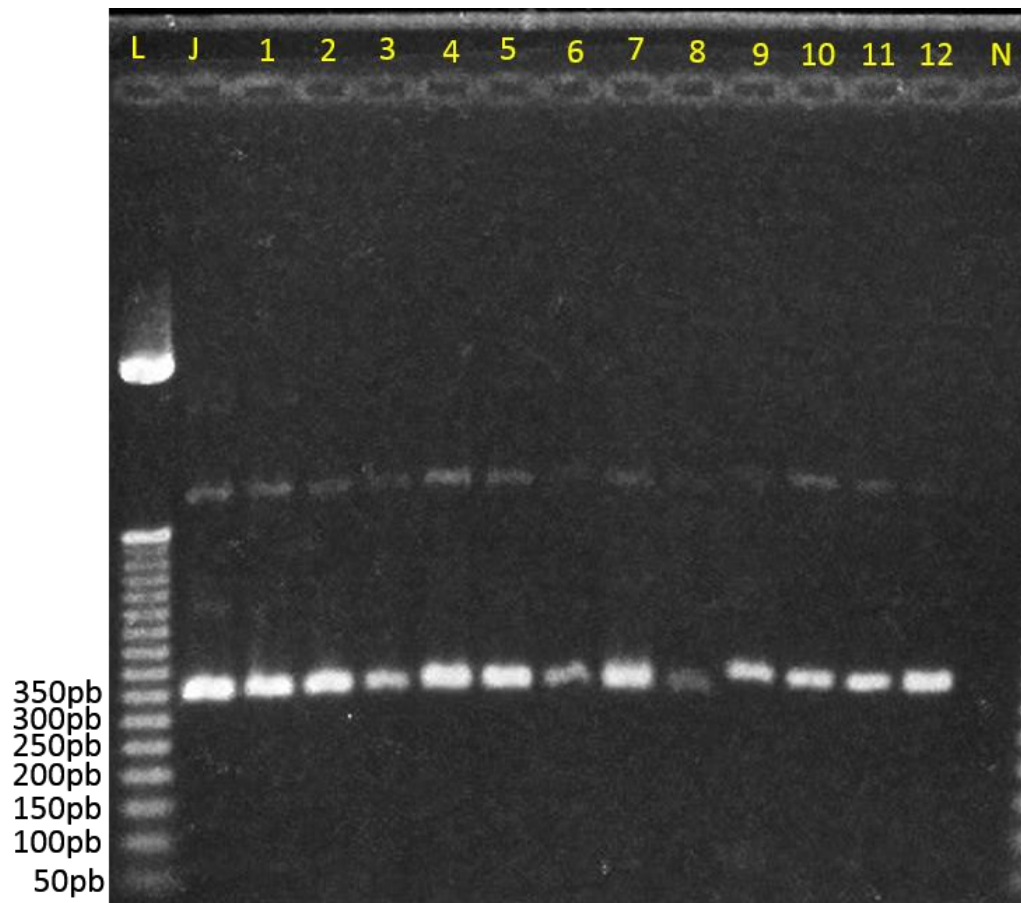


Figura 12. Detección del linaje TcI utilizando el marcador min exón (Tc y TcII) en mamíferos terrestres silvestres de El Zapotal. L) marcador de peso molecular (escalera) de 50pb, J) control positivo cepa Julieta de 350pb, N) control negativo. Carril 1-6: *Didelphis marsupialis*, Carril 7-10: *Peromyscus mexicanus*, carril 11: *Heteromys desmarestianus* y carril 12: *Dasyprocta mexicana*.

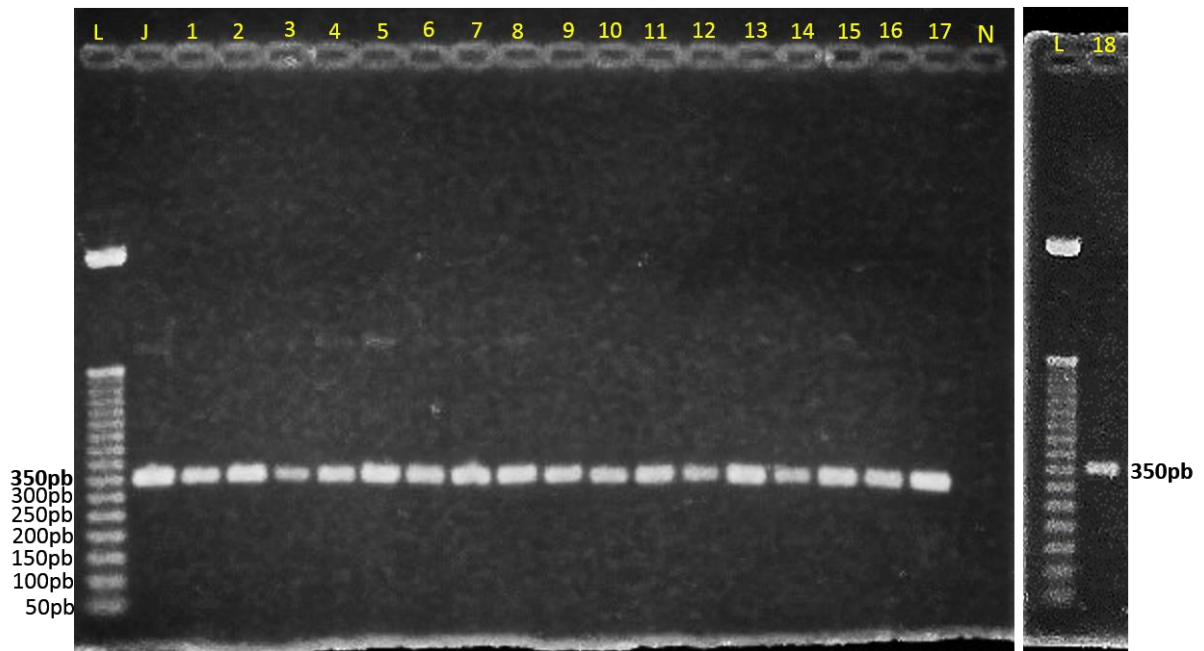


Figura 13. Detección del linaje TcI utilizando el marcador min exón (oligos Tc y TcII) en Quirópteros del Zapotal. L) marcador de peso molecular escalera de 50pb, J) control positivo cepa Julieta de 350pb, N) control negativo. Carril 1-10: *Artibeus jamaicensis*, carril 11-13: *Artibeus lituratus*, carril 14 y 15: *Carollia perspicillata*, carril 16: *Glossophaga soricina*, carril 17 y 18: *Sturnira lilium*.

Cuadro 4. Especies de mamíferos positivos a la infección por *T. cruzi* del linaje TcI.

Especie	No. de individuos muestreados	No. individuos infectados	Porcentaje de infección (%)
<i>Didelphis marsupialis</i>	18	6	33.33
<i>Peromyscus mexicanus</i>	7	4	57.14
<i>Heteromys desmarestianus</i>	10	1	10
<i>Dasyprocta mexicana</i>	7	1	14.2

Cuadro 5. Especies de quirópteros positivos a infección por *T. cruzi* determinado por PCR tiempo real con sondas TaqMan.

Especies	No de individuos muestreados	No de individuos infectados	Porcentaje de infección (%)
<i>Artibeus jamaicensis</i>	64	10	15.62
<i>Artibeus lituratus</i>	16	3	18.75
<i>Carollia perspicillata</i>	7	2	28.57
<i>Glosophaga soricina</i>	8	1	12.5
<i>Sturnira lilium</i>	3	2	66.66

Cuadro 6. Prevalencia de infección por *T. cruzi* en mamíferos silvestres muestreados en la reserva ecológica “El Zapotal”

Mamíferos	No de individuos	Prevalencia de infección por <i>T. cruzi</i>
Quirópteros	110	16.36 %
Mamíferos terrestres	42	28.57 %
Total de mamíferos silvestres	152	19.73 %

VIII.DISCUSIÓN

La sangre de los mamíferos puede emplearse en estudios patológicos, virológicos y de resistencia de enfermedades, por lo que es conveniente conservar muestras cuando sea posible (Romero-Almaraz *et al.*, 2000). Sin embargo Muñoz *et al.* (2016) señalan que la hematología de animales silvestres se enfrenta a múltiples retos por la gran diversidad de especies, que es reflejada también en la diversidad de algunos elementos sanguíneos, esto aunado a la falta de información hematológica de muchas especies en el mundo lo cual genera sesgos en el establecimiento de protocolos para el correcto manejo y estudio de los especímenes, la sangre muestreada en este estudio tenía la particularidad de coagularse con rapidez, en animales silvestres el aumento de componentes sanguíneos, como pueden ser las plaquetas, es común en animales silvestres (Villalba-alemán y Muñoz-Ramos, 2016), es así como existen algunos anticoagulantes que se deciden usar dependiendo a la información que se requiera obtener, para conseguir extracciones de DNA son usados principalmente la heparina de sodio, heparina de litio y el EDTA, sin embargo tanto la heparina de sodio

como la de litio presentan la desventaja de poder presentar degeneración nuclear por lo que no se recomiendan pruebas como la PCR y también pueden presentar coagulación tardía, el EDTA por el contrario proporciona muestras útiles para un amplio rango de análisis de laboratorio, análisis bioquímicos, de biología molecular (ADN, ARN, microARN), proteómica, etc. Por otro lado el Citrato de sodio aunque también puede ser usado en pruebas moleculares es recomendado usarlo principalmente en pruebas de coagulación (Martí-Pérez *et al.*, 2015; Muñoz, 2016), el alcohol aunque no es un anticoagulante es usado para almacenar muestras que pueden ser utilizados para pruebas moleculares, sin embargo es usado esencialmente en muestras de tejidos sólidos, pues en sangre presenta coagulación (Rizo-Aguilar *et al.*, 2015), de acuerdo a lo anterior y a los resultados que se obtuvieron (Figuras 9 y 10) los anticoagulantes idóneos para el estudio molecular de sangre de mamíferos silvestres son el EDTA seguido del Citrato.

La cantidad de sangre que se obtuvo en campo está estrechamente relacionado con el tamaño del organismo muestreado, siendo así el grupo de los murciélagos de los que se pudo obtener la mínima cantidad. Joslin (2009) señala que la cantidad de sangre a extraer es variable y dependerá principalmente del peso y la talla del individuo, en general un vertebrado debe de tener entre 6 y 10% de sangre respecto al peso vivo del animal, de esta manera, un animal que pesa 100gr cuenta con un total de 6 a 10ml de sangre (un gramo corresponde a un mililitro), de ese total se puede colectar un 10%, así pues la cantidad mínima de sangre que se obtuvo con las especies más pequeñas como *Glossophaga soricina* que en promedio pesa 10gr pudiendo obtener hasta 0.06ml de sangre. Por otro lado especies considerados más grandes como los murciélagos del género *Artibeus* se puede obtener hasta 0.24 ml de sangre de igual forma es posible obtener más sangre en especies más grandes como *Didelphis marsupialis*. De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro 3) podemos decir que la cantidad de sangre que se obtuvo en campo fue la suficiente para evitar perturbar demasiado a los organismos y para obtener buenas extracciones de DNA.

Elegir el método de extracción de DNA es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de

conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados (Alejos-velázquez *et al.*, 2014; Ríos-Sánchez *et al.*, 2016). En este sentido el método de extracción a elegir será en función de los recursos con el que se cuente y en el diseño experimental del estudio que se realizará, así, aunque el método de sales o “salting-out” resulta ser un método laborioso pues toma hasta cuatro días terminarla tiene la ventaja de ser muy económica, además diversos autores señalan que este método permite la recuperación de grandes fragmentos de DNA (hasta 30 kb) y es menos tóxico en comparación con otro método de extracción muy usado como es el fenol – cloroformo o la variación cloroformo – alcohol isoamílico (Baena Del Valle *et al.*, 2013; Ríos-Sánchez *et al.*, 2016). Por otro lado los kits comerciales disminuyen la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes, estos utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas (Alejos-velazquez *et al.*, 2014), como podemos ver estos kit mejoran las técnicas de extracción notablemente (Figura 10) sin embargo la gran desventaja de estos es su alto costo comercial y que no recupera tanto DNA como en el método anterior. El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana (Alejos-velazques *et al.*, 2014), los resultados obtenidos nos indican que requiere de poca muestra inicial para este método (cuadro 3). Osorio-Cadavid *et al.* (2009), Baena Del Valle *et al.* (2013) y Ríos-Sánchez *et al.* (2016) Indican que una técnica de extracción ideal es aquella que posee un número limitado de pasos, mínima utilización de disolventes peligrosos, requerimiento limitado de equipos y que sea relativamente económica, ambos métodos analizados en este estudio podrían cumplir con algunos de estos estándares la elección del método a usar será en función los objetivos del proyecto y de los recursos que se tengan disponibles.

Se obtuvo una prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* total de 19.73% (de 152 mamíferos silvestres muestreados) (Cuadro 6), esto es mayor a lo reportado

por Domínguez *et al.* (1990) con un 11% de positividad de 73 especímenes silvestres dentro de la misma reserva. Cabe señalar que las pruebas que realizaron fueron de xenodiagnóstico e histológicas donde pudieron hallar amastigotes anidados en tejido cardiaco. La mayor prevalencia de infección que se encontró en este estudio fue con los mamíferos terrestres 28.57% de infección en 42 mamíferos muestreados, esto es mucho mayor a lo encontrado por Solis-Franco *et al.* (1997) 9.21% de 141 mamíferos muestreados, estos autores reportan infección en dos roedores *Peromyscus mexicanus* con (5/80, 6.3%) y *Heteromys desmarestianus* (6/34, 17.6%) estas prevalencias difieren a los hallados en este estudio 57.14% y 10% respectivamente (cuadro 4), sin embargo se debe tomar en cuenta que el número de mamíferos muestreados es inferior a lo encontrado por los autores, cabe mencionar que estos autores también capturaron murciélagos, sin embargo ninguno salió positivo. Los roedores son considerados como parte de los reservorios naturales de *Trypanosoma cruzi*, en especial los roedores caviomorfos (*Dasyprocta mexicana* Familia Dasyproctidae) son considerados especies que pudieron haber co-evolucionado con el genotipo TcI de *T. cruzi* siendo este linaje autóctono de América del Sur (Deane *et al.*, 1986; Herrera, 2010). Si separamos a los mamíferos terrestres en los dos órdenes representativos Didelphimorphia y Rodentia podemos notar que 6 roedores de los 42 mamíferos muestreados presentan infección por *T. cruzi* (14.28%) y 6 didelphimorfos también presentan infección (14.28%), así pues podemos decir que la infección por *T. cruzi* dentro la reserva del Zapotal está mantenida de igual forma por dos órdenes de mamíferos terrestres Rodentia y Didelphimorphia, esto concuerda con lo hallado por Camacho-Sierra (2016) quien reporta una prevalencia de 26.66% (16/60) mantenida por Didelphimorfos de tres especies dentro de la Reserva el Zapotal, además reporta también la circulación del linaje TcI. Al igual que los roedores los didelphidos son considerados reservorios naturales y ancestrales del parásito y estos también están fuertemente ligados al linaje TcI, además se sabe que estos mamíferos pueden mantener altos niveles de parasitemia (Deane *et al.*, 1986; Náquira y Cabrera, 2009; Herrera, 2010; Ceballos, 2010).

Dentro del estado de Chiapas no se ha reportado con anterioridad infección por *T. cruzi* en murciélagos. Sin embargo, es bien sabido que el orden Quiróptera es

también un reservorio natural del parásito y este mantiene un genotipo especial el TcBat el cual está muy ligado al linaje TcI, incluso se ha reportado infección humana por parte del este mismo genotipo (Marcili *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2013).

Es importante poder inferir el origen de la infección de estos animales silvestres, es bien sabido que el principal vector de este parásito es el insecto triatomino conocido como chinche o talaje, sin embargo durante este estudio no se encontró ninguna chinche, esto concuerda con lo reportado por Solis-Franco *et al.*, (1997) quien menciona no haber encontrado alguna chinches en la zona a pesar de que la comunidad aledaña si tiene conocimiento de este insecto, así pues infieren que la infección se lleva a cabo principalmente por canibalismo o necrofagia. Si bien ya entre los años 1930 y 1950 se consideraba la transmisión por vía oral como un posible mecanismo de transmisión en animales silvestres a través de la ingesta de deyecciones de triatomino, el conjunto de datos obtenidos en esa época indicaban efectivamente la posibilidad de infección de reservorios por la ingestión: i) de triatominos; ii) de alimentos contaminados por heces de los insectos; iii) de otros animales infectados; y, iv) por la secreción de algunos de ellos, por lo menos de *Didelphys sp.* (Jensen y Daene, 1985; Silveira, 2006; Toso *et al.*, 2011), años más tarde verificó que este mecanismo de transmisión podía involucrar al hombre. Después del trabajo pionero de Schenone *et al.*, (1982) se ha considerado la transmisión de *Trypanosoma cruzi* vía oral como parte habitual del ciclo enzoótico de este parásito, a través de la ingestión por mamíferos susceptibles de vectores portadores del parásito o de sus deyecciones, así como de reservorios infectados. Así pues la alimentación de los mamíferos que resultaron infectados está estrechamente relacionado con los posibles mecanismos de transmisión antes mencionados, siendo los roedores y los marsupiales los cuales al tener una alimentación más versátil pueden infectarse con más facilidad, cabe destacar que las cinco especies de quirópteros que resultaron infectados tienen una alimentación principalmente de frutas y semillas y en menor grado pueden consumir néctar e insectos (Hutson *et al.*, 2001; Schnitzler y Kalko, 2001) por lo cual podemos inferir una transmisión por parte de alimento contaminado con heces de triatominos o la ingesta directa de este, por lo que no se descarta la nula existencia del insecto vector en la zona.

El linaje TcI hallado en la zona concuerda con lo hallado por Camacho-sierra (2016) en la misma reserva, el fragmento con un tamaño de 350pb correspondiente al linaje TcI (Figura 12) concuerda con lo reportado por Mejia y Triana (2005) y Pérez-España *et al.* (2019) usando los mismo oligonucleótidos. TcI es el genotipo más abundante y ampliamente distribuido en América, concentrándose la infección humana en Centroamérica y en países del Norte de Sudamérica, de acuerdo a Ceballos (2010) y Mantilla *et al.* (2010) este genotipo estaría relacionado tanto con ambientes silvestres, como domésticos, siendo en este último más prevalente. El linaje que predomina en la parte norte de Sur América es el linaje TcI, tanto en ciclo silvestre como doméstico, igualmente en Norte América y en países de Centro América tales como México, el linaje predominante es el TcI (Bosseno *et al.*, 2002).

La técnica de PCR multiple (mPCR) es la más usada cuando se trata de amplificar los oligonucleótidos para determinar linajes de *T. cruzi*, sin embargo para este estudio se optó por separar los oligos para poder corroborar la presencia del linaje TcI (Figuras 12), Bolivar *et al.* (2014) Menciona que para obtener buenos resultados en una PCR múltiple es necesario ser muy cuidadosos con el diseño experimental, especialmente en el diseño de primers pues cuando en una mPCR se usan oligos que son complementarios entre si estos se unen y forman los llamados dímeros de primers (Figura 11) reduciendo así la cantidad de oligos disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés. Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos con la aplicación de dos pruebas PCR (punto final y tiempo real) podemos señalar que el uso de la PCR en tiempo real es mucho más sensible que la punto final debido a que puede detectar y cuantificar pocos fragmentos de DNA ya que pudo detectar fragmentos de *T. cruzi* aún con los dímeros de primers formados. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Duffy, 2010; Tamay De Dios *et al.*, 2013)

IX. CONCLUSIÓN

Se confirma el genotipo linaje Tc1 circulando entre mamíferos silvestres de la Reserva ecológica el Zapotal en Tuxtla Gutiérrez Chiapas, el parásito es mantenido por mamíferos considerados como sus reservorios naturales y el medio de transmisión entre estos reservorios puede ser por carnívora, canibalismo, necrofagia o por la acción activa o pasiva del insecto vector Triatomino. Se determina una prevalencia de infección por *T. cruzi* del 19.73% mantenido por mamíferos silvestres tanto voladores como terrestres.

La evaluación de los métodos de extracción nos permitió determinar que para estudios moleculares en muestras sanguíneas de mamíferos silvestres los anticoagulantes que brinden mejores extracciones es el EDTA y el citrato de sodio 3.8% y la cantidad de sangre a extraer dependerá del peso del organismo y del método de extracción que se desee emplear, esto con el fin de evitar perturbar a las especies silvestres durante el muestreo.

VIII. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Acosta, N. y López, E. 2013. Cepas de *Trypanosoma cruzi* en el Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 11 (2): 78-89.
- Alejos-Velázquez, L., Aragón-Martínez, M. y Cornejo-Romero, A. 2014. Extracción y Purificación de ADN. En: Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., Rocha-Munive, G. Herramientas Moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Ed. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Pp 1-25.
- Aljanabi, S. y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*. 2 (22): 4692-4693.

- Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A. y Gascon, J. 2017. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 17 (7): 699-710.
- Apt, W., Heitmann, I., Jercic, M., Jofré, L., Muñoz, P., Noemí, I. y Zulantay, I. 2008. Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 25 (5): 380-383.
- Baena Del Valle, J., Ramos-Moreno, A., Gómez-Alegría, C. y Gómez-Camargo, D. 2013. Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Rev. Colombiana Biotecnol.* 15 (1): 172-179.
- Barret, M., Burchmore, R., Stich, A., Lazzari, J., Frasc, A., Cazzulo, J. y Krishna, S. 2003. The Tripanosomiasis. *Lancet*. 362: 1469–1480.
- Bolivar, A., rojas, A. y García-Lugo, P. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*. 3 (1): 25-33.
- Bosseno, M., Barnabe, C., Magallón, E., Lozano, F., Ramsey, J., Espinoza, B. y frédérique, S. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Linaje I in México. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (2): 627-632.
- Botero, D. 1998. Parasitosis Humana Tercera Edición. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Colombia. Pp 203-226.
- Bueno-Duarte, Y. 2007. Estudio comparativo de proteínas antigénicas de cepas de *Trypanosoma cruzi* de la región nororiental de Colombia. Plan de proyecto de grado. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias escuela de Química Bucaramanga. Colombia.
- Camacho-Sierra, V. 2016. Identificación de unidades discretas de tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en marsupiales (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginianus*, *Philander oposum*) presentes en la reserva ecológica "El Zapotal" en el estado de Chiapas. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias

agropecuarias y recursos naturales. Universidad Autónoma del estado de México. México D.F.

Carrada-Bravo, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista mexicana de parasitología clínica*. 51 (4): 205-219.

Castillo, D. y Wolff, M. 2000. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*. 20: 59-64.

Cazorla, D. y Nieves, E. 2010. Triatominae de Venezuela: distribución geográfica, aspectos taxonómicos, biológicos e importancia médica. *Avances Cardiológicos*. 30 (4):347-369.

Ceballos, L. 2010. Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Centro Nacional de programas preventivos y control de enfermedades (CENAPRECE). 2015. Manual de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Subsecretaría de la prevención y promoción de la salud. México. 56pp.

Concha, F. 2015. Diagnostico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y donantes en sangre) validación de antígeno Hierro superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODE) de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.

Cosentino, R. y Agüero, F. 2012. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS neglected tropical diseases*. 6 (7): e1777.

Deane, M., Lenzi, H., y Jansen, A. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Vertebrate and Invertebrate cycles in the same Mammal host, the Opossum *Didelphis marsupialis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 79 (4): 513-515.

De Fuentes- Vicente J., Vidal-López, D., Gutiérrez-Jiménez, J. y Schlie-Guzmán, A. 2016. Tasa de infección y tiempo de defecación de los estadios ninfales de

Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) después de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*. 278 (3): 111-117.

De Fuentes-Vicente, J., Gutiérrez-Cabrera, A., Flores-Villegas, A., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P. y Córdoba-Aguilar, A. 2018. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi* triatomine interactions. *Acta tropical*. 183; 23-31.

De Fuentes-Vicente, J., Vidal-López, D., Flores-Villegas, A., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M., Salazar-Schettino, P. y Gutiérrez-Cabrera, A. 2019. *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta tropica*. 195: 51-57.

Devera, R., Fernandes, O. y Rodrigues, J., 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A Review of the parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after *in vitro* Culturing and Mice Infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98 (1): 1-12.

Domínguez, A., Ricárdez, J., Espinoza, E. 1990. Study of *Trypanosoma cruzi* in wild reservoirs in the ecological reserve of El Zapotal, Chiapas, México. *Boletín Chileno de parasitología*. 45 (1-2): 3-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2152354/>. Consultado 05 mayo 2020.

Duffy, T. 2010. Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires UBA. Buenos Aires.

Fernández-Moreno, Y. 2010. Percepciones ambientales sobre una Reserva Ecológica Urbana *El Zapotal*, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tesis de Doctorado. Colegio de la Frontera Sur ECOSUR. México.

Flores-Chávez, M., De Fuentes, I., Gárate, T. y Cañavate, C. 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 25: 29-37.

- García-Jordán, N., Berrizbeitia, M., Concepción, J., Aldana, E., Cáceres, A. y Quiñones, W. 2015. Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*. 35: 247-257.
- Garduño-Pineda, C. 2013. Empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos clínicamente sanos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.
- Guillén-Ortega, F., Pérez-Vargas, A., Estrada-Suárez, A., Moleres-Villegas, J., Ricárdez-Esquinca, J., Monteón-Padilla, V. y Reyes, P. 2005. Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en pacientes con miocardiopatía dilatada en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Archivos de Cardiología de México*. 75: 49-54.
- Gulh, F. 2009. Enfermedad de Chagas; Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica*. 20: 228-234.
- Herrera, L. 2010. Una revisión sobre reservorios de *Typanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) agente causal etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 50 (1): 3-15.
- Hutson, A., Mickleburgh, S. y Racey, P. 2001. Global status survey and conservation action plan: Microchiropteran bats. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group.
- Jansen, A. M., y Deane, M. P. 1985. *Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis*. *Reunião sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas*. 12: 39.
- Jimenez-Coello, M., Poot-Cob, M., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E., Ramos-Ligonio, A., Sauri-Arceo, C., Acosta-Viana, K. 2008. American Trypanosomiasis in Dogs from an Urban and Rural Area of Yucatan, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 10: 135-14.
- Joslin, J. 2009. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 18 (2): 117-139

- Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. protozool.* 27 (1): 37-58.
- López-Bello, R. 2013. Niveles de Infestación Domiciliar de *Triatoma longipennis* en el Área de Influencia del sistema de bombeo purgatorio arcediano, en el municipio de Zapotlanejo, Jalisco. Tesis de Maestría. Instituto Nacional de Salud Pública Centro Regional de Investigación en Salud Pública. México.
- Mantilla, J., Zafran, G., Macedo, A. y González, C. 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology.* 41: 610-613.
- Martí-Pérez, S., Abril-Tomo, C., Bosh-Comas, A. Rodríguez-Ayerbe, C. 2015. Capítulo 3 Criterios de Trabajo según la muestra y el estudio destinado. En: Muñoz-Fernandez, A. Los Biobancos en la era “ómica”: Derivados hemáticos. Ed. Red Nacional de Biobancos. México. Pp 20-28.
- Martínez-Hernández, F., Rendon-Franco, E., Gama-Campillo, L., Villanueva-García, C., Romero-Valdovinos, M., Maravilla, P. y Villalobos, G. 2014. Follow up of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in two mammals species, *Nasua narica* and *Procyon lotor* (Carnivora: Procyonidae): evidence of infection control?. *Parasites & Vectors.* 7: 405.
- Martínez, I., Cervantes-Landín, A. y Espinoza, B. 2013. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica de México.* 149: 363-365.
- Martínez, R. 1996. Variabilidades Intraespecíficas en *Trypanosoma cruzi* y Ensayos de Nuevos Métodos para el Cribado Farmacológico. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Animal I y Parasitología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A., Veludo, H., Maia Da Silva, F. y Teixeira, M. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and

- Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 136: 641-655.
- Mazariegos-Arana, M., Monteón, V., Ballinas-Verdugo, M., Hernandez-Becerril, N., Alejandre-Aguilar, R. y Reyes, P. 2001. Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* infection in different geographic zones of Chiapas, Mexico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34: 453-458.
- Medellín, R., Arita, H. y Sánchez, O. 2008. Identificación de los murciélagos de México, Clave de campo. 2da edición. Ed. Instituto de Ecología, UNAM. México. 78pp.
- Mejía, A. y Triana, O. 2005. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órgano de ratones. *Biomédica*. 25: 76-86.
- Ministerio de Salud de la Nación (MINSAL). 2018. Enfermedades infecciosas; Chagas atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*, Guía para el equipo de salud. Secretaría de Gobierno de la salud. Buenos Aires. Argentina. 95pp.
- Miranda, F. 2015. La Vegetación de Chiapas. Cuarta Edición. Ed. Universal de Ciencias y Artes de Chiapa. México. 253pp.
- Muñoz, C., Solari, A., Apt, W. y Zulantay, I. 2013. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología*. 72 (1): 5-21.
- Muñoz, C., Rendón, F., López, O., Ruiz, R., Ceballos, N., Villanueva, C., Rodas-Martinez, A., Valle, C., Trillanes, C. y Arellano, O. 2016. Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Náquira, C. y Cabrera, R. 2009. Breve reseña histórica de la Enfermedad de Chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. 26 (4): 494-504.
- Noireau, F., Diosque, P. y Jansen, A. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*. 40 (2): 1-23.

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1998. Tratamiento Etiológico de la enfermedad de Chagas; Conclusiones de una consulta técnica. *Oswaldo Cruz*. 34pp.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2006. Estimación Cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. *Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), Innovative and Intensified Disease Management (IDM) WHO/ NTD/ IDM*. 29pp.
- Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., y Mambuscay, L. A. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1): 125-131.
- Palau, M. 1996. Estudio experimental del impacto de la estructura clonal de *Trypanosoma cruzi* sobre aspectos Medico-Biológicos. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Palacios, E., Beutelspacher, C. y Sarmiento, O. 2016. Vegetación y flora del Parque Ecológico y Recreativo “El Zapotal”, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Lacandonia*. 10 (1): 37-86.
- Pereira, A. y Pérez, M. 2003. Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *Offarm: farmacia y sociedad*. 22 (2): 104-111.
- Pérez-España, V., Morales-Evangelista, C., Vazquez-Chagoyá, J., Valladares-Carranza, B., Romero.Cortés, T., Cuervo-Parra, J., Martínez-Hernandez, I., Noguez-García, J. y Aparicio-Burgos, J. 2019. Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatominos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México. *Nova Scientia*. 22 (11): 171-185.
- Ramírez, J., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A., Parra, E., Cucunubá, Z. 2013. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*. 61: 477–479.
- Ramsey, J., Odoñez, R., Tello-López, A., Pohls, J., Sánchez, V. y Peterson, A. 2014. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México:

- Iniciativa para la vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en México.*
Ed. Instituto Nacional de Salud Pública, México. PP 85-104.
- Rassi, A., Anis, R. y Marín-Neto, J. 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375 (9723): 1388-1402.
- Reid, F. 2009. A field guide of the Mammals of central America and Southeast México. second edition. Ed. Oxford university press. New York. 238pp.
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., y Pérez-Morales, R. 2016. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*. 26(4): 56-65.
- Rizo-Aguilar, A., Ávila-Torresagatón, L., Fuentes, L., Lara, A., Flores, G. y Albino, S. 2015. Técnicas para el estudio de los murciélagos. En: Gallina-Tessaro, S. Manual de Técnicas del estudio de fauna. Ed. Instituto literario de Veracruz. Pp 163-188.
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. y González-Roldán, J. 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*. 154; 605-612.
- Romero-Almaraz, M., Sánchez-Hernández, C., García-Estrada, C. y Owen, D. 2000. Mamíferos pequeños: manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. Ed. Las prensas de ciencias. UNAM. México. 324pp.
- Ruggiero, M., Gordon, P., Orrell, T., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. y Kirk, P. 2015. A High Level Classification of all Living Organisms. *PLoS ONE*. 10 (4): e0119248.
- Ruiz-Piña, H. y Cruz-Reyes, A. 2002. The Opossum *Didelphis virginiana* as a Synanthropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5): 613-620.
- Salazar-Schettino, P., Haro-Artega, I y Cabrera-Bravo, M. 2005. Tres especies de importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina*. 65: 63-69.

- Salazar-Schettino, P., Bucio-Torresa, M., Cabrera-Bravo, M., Alba-Alvarado, M., Castillo-Saldaña, D., Zenteno-Galindo, E., Rojo-Medina, J., Fernández-Santosa, N. y Perera-Salazar, M. 2016. Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 59(3): 6-16.
- Sánchez, L. 2018. Identificación de Linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en Chagas congénito: un estudio basado en madres transmisoras y no transmisoras. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Schenone, H., Gonzalez, H., Schenone, H. y Rojas, A, 1982. Experimental infection of rats with *Trypanosoma cruzi* by oral route. *Bol. Chil. Parasitol.* 37 (1/2): 2-9.
- Schnitzler, H. y Kalko, E. 2001. Echolocation by insect-eating bats. *BioScience*. 51:557–569.
- Silveira, A. 2006. Factores de Riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de Chagas. En: Organización Panamericana de la Salud. Informe de la consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Brasil. Pp16-19.
- Solís-Franco, R., Romo-Zapata, A., Martínez-Ibarra, J. 1997. Wild Reservoirs Infected by *Trypanosoma cruzi* in the Ecological Park “El Zapotal”, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92: 163-164.
- Souto, R. y Zingales, B. 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 62 (1): 45-52.
- Sunnucks, P y Hales, D. 1996. Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and evolution*. 13 (3): 510-524.

- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. 2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2(2): 70-78.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. 1991. Towards a Population Genetics of Microorganisms: The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. *Parasitology Today*. 7 (9): 228-232.
- Toso, A., Vial, F. y Galanti, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev med Chile*. 139: 258-266.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. 1991. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México*. 34 (2): 186-196.
- Velasco-Castrejón, O. y Rivas-Sánchez, B. 2008. Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. *Boletín médico del Hospital infantil de México*. 65: 57-79.
- Vidal-Acosta, V. e Ibáñez-Bernal S. 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de México*. 42 (6): 496-503.
- Villalba-Alemán, E. y Muñoz-Romo, M. 2016. Estudio de la variación de perfiles hematológicos de murciélagos. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época*. 6 (1): 1-14.
- World Health Organization (WHO). 2002. Control of Chagas Disease: second report of the WHO Expert committee. Ed. World Health Organization. pp 40-52.
- Zavala-Velázquez, J., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, M., Guzmán-Marín, E., Ruíz-Piña, H. 1996. Infection by *trypanosoma cruzi* in mammals in yucatan, México: a serological and parasitological study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 38 (4): 289-292.
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M. Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macdo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm,

N., Tibayrenc, M. y Schijman, A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revisión meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (7): 1051-1054.