

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

“Identificación de Unidades Discretas de  
Tipificación (DTU) de aislados de  
*Trypanosoma cruzi* de Chiapas y Oaxaca,  
México”.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**CARLOS GARCÍA LÓPEZ**

Director

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Asesoras

M. en C. Christian Ruiz Castillejos

M. en C. Nancy Gabriela Santos Hernández

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2021





**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 20 de octubre de 2021

C. Carlos García López

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Identificación de Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de aislados

de *Trypanosoma cruzi* de Chiapas y Oaxaca, México.

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. Javier Gutiérrez Jiménez

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

**Firmas:**

Ccp. Expediente



<b>ÍNDICE</b>	
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	- 4 -
<b>RESUMEN</b> .....	- 5 -
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	- 6 -
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	- 7 -
2. 1 Enfermedad de Chagas .....	- 7 -
2.1.1 Distribución de la enfermedad de Chagas .....	- 8 -
2.1.2 Mecanismos de infección .....	- 10 -
2.1.3 Características clínicas y fases de la enfermedad de Chagas.....	- 12 -
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	- 13 -
2.2.1 Clasificación taxonómica .....	- 13 -
2.2.2 Ciclo de vida.....	- 13 -
2.2.3 Reservorios .....	- 15 -
2.3 Variación genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	- 15 -
2.3.1 Nomenclatura de <i>T. cruzi</i> .....	- 16 -
2.3.2 Linajes de <i>T. cruzi</i> .....	- 17 -
2.3.3 Unidades Discretas de Tipificación (DTU) .....	- 17 -
2.3.3 Modelo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	- 19 -
2.3.3 Modelos principales de origen de las DTU's.....	- 20 -
2.3.4 Distribución geográfica de las DTU's .....	- 21 -
2.3.5 Importancia del estudio genético de <i>T. cruzi</i> .....	- 23 -
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	- 24 -
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	- 27 -
<b>V. ZONA DE ESTUDIO</b> .....	- 28 -
<b>VI. MÉTODOS</b> .....	- 29 -
6.1 Muestras de <i>T. cruzi</i> .....	- 29 -
6.2 Extracción de ADN por método de gradiente de sales. ....	- 30 -
6.3 Determinación de linajes ancestrales TcI y TcII de <i>T. cruzi</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	- 31 -
6.3.1 Determinación de las unidades discretas de tipificación (DTU) de <i>T. cruzi</i> basado en la amplificación por PCR del fragmento del gen c-5 esteroles desaturasa (TcSC5D).....	- 32 -
6.3.2 Análisis de secuencias de genes del gen c-5 esteroles desaturasa para la determinación de DTU .....	- 33 -
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	- 35 -

7.1 Determinación de linajes ancestrales TcI y TcII de <i>T. cruzi</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). .....	- 35 -
7.1.1 Amplificación del gen C-5 esteroI desaturasa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	- 36 -
7.1.2 Determinación de las de Unidades Discretas de Tipificación. ....	- 37 -
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	- 41 -
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	- 44 -
<b>VII. REFERENCIAS DOCUMENTALES</b> .....	- 45 -

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en los continentes. Obtenido en: World Health Organization Observatory Map Gallery. ....	- 9 -
Figura 2. Distribución de Chagas en México. El mapa muestra el rango total de casos de Chagas reportados durante 1928 a 2004. Fuente: Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.....	- 10 -
Figura 3. Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Toso et al., 2011). ....	- 14 -
Figura 4. Modelos evolutivo de Two-Hybridization y Three Ancestor que explica las hibridaciones entre DTU's (Zingales et al 2012). ....	- 21 -
Figura 5. Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con los ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre o doméstico (Guhl, 2013). ....	- 22 -
Figura 6. Distribución de las Unidades Discretas de Tipificación de <i>T. cruzi</i> en el territorio Mexicano (Martínez, 2018). ....	- 23 -
Figura 7. Municipios y localidades de Chiapas y Oaxaca, modificado de Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2015). ....	- 28 -
Figura 8. Sitios polimórficos claves para la identificación de DTU's con el gen C-5 esteroles desaturasa (Consentino et al, 2012).....	- 34 -
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen miniexón: Pozo 1 marcador de peso molecular de (50pb), pozo 2 Mp/Qro (350pb), pozo 3 cepa Y (300pb), pozo 4 ADRIAN (300pb), pozo 5 ADAN (300pb), pozo 6 ANTONIO (300pb), pozo 7 RATON (300pb), pozo 8 PHYLOSO -	- 35 -
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen C-5 sterol desaturase: Pozo 1 marcador de peso molecular de (100pb), pozo 2 Mp/Qro (800pb), pozo 3 Tuxtla (800pb), pozo 4 ADRIAN (800pb), pozo 5 ADAN (800pb), pozo 6 ANTONIO (800pb), pozo 7 RATON (800pb),.....	- 37 -
Figura 11. Distribución de DTU's de aislados en las localidades de Chiapas y Oaxaca, México..	- 40 -
-	-

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> de Chiapas y Oaxaca, México. ....	- 30 -
Cuadro 2. . Oligonucleótidos para los genes miniexón y TcSC5D reportados por Souto <i>et al.</i> (1996) y Cosentino <i>et al.</i> (2012).....	- 33 -
Cuadro 3. Determinación de linajes de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	- 36 -
Cuadro 4. Sitios polimórficos de aislados de <i>T. cruzi</i> . ....	- 38 -
Cuadro 5. Unidades discretas de tipificación identificadas de los aislados de <i>T. cruzi</i> de Chiapas y Oaxaca. ....	- 39 -

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una infección producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad es un problema importante de salud pública en América latina afectando entre 6 a 7 millones de personas alrededor del mundo. En la actualidad se conoce que *T. cruzi* está compuesto por diversos genotipos que presentan un alto grado de variación cuando son analizados por métodos bioquímicos y moleculares, presentando distintas características biológicas y afectaciones en el humano. En la actualidad estos genotipos han sido agrupados en siete Unidades Discretas de Tipificación (DTU), denominados TcI-TcVI y Tcbat. En México se han reportado seis de las siete DTU's con excepción de Tcbat. Sin embargo, los trabajos de identificación siguen siendo muy escasos, por lo cual con el presente trabajo tuvo como objetivo la identificación de DTU's de *T. cruzi* obtenidos de *Triatoma dimidiata* recolectados en trabajos anteriores por el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM) y la facultad de ciencias químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez, de localidades de Chiapas y Oaxaca, zonas consideradas endémicas de la enfermedad de Chagas. La identificación de las DTU's se realizó mediante la amplificación del gen miniexón que discrimina a *T. cruzi* en dos grupos denominados linajes ancestrales (TcI y TcII) y el análisis del gen C-5 esterol desaturasa que discrimina a las siete DTU's mediante el análisis de ocho sitios polimórficos en las secuencias. Se obtuvo la identificación de 17 aislados mediante la amplificación del gen miniexón obteniendo un total de seis aislados pertenecientes a TcI y 11 a TcII, mientras que con el análisis del gen C-5 esterol desaturasa solo se lograron identificar 11 aislados, donde se obtuvieron cinco aislados que fueron identificados erróneamente mediante la visualización de la amplificación del gen miniexón. Con el análisis de estos dos genes se obtuvo la identificación de tres DTU's TcI, TcII y TcIV, con lo que se reportó DTU's nuevas en Chiapas con TcII y en Oaxaca con TcI, por lo que los estados de Chiapas y Oaxaca tienen varios genotipos circulando en el vector *Triatoma dimidiata* y en el ciclo domestico de la enfermedad.

## I. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es una infección producida por un protozoo flagelado denominado "*Trypanosoma cruzi*". Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay de 6 a 7 millones de personas portadoras de la enfermedad alrededor del mundo, siendo América latina la más afectada. En México se tiene un estimado de alrededor de 1.1 millones de personas infectadas y 29 millones más se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad por vivir en áreas endémicas. Actualmente, en nuestro país se tienen un total de 18 áreas determinadas como endémicas de la enfermedad, ubicadas primordialmente en el Sureste. Estas áreas incluyen los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos, principalmente en las zonas rurales. Lo anterior hace que la enfermedad de Chagas sea uno de los problemas de salud pública más graves y una de las endemias más expandidas en México y en el continente americano (Hotez *et al.*, 2013).

La principal fuente de infección en zonas endémicas de la enfermedad es por la vía vectorial, esta transmisión es llevada a cabo por el contacto de las heces contaminadas de insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae, de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, que se agrupan en 151 especies. En México se han registrado 31 especies de los cuales *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata* y el complejo phyllosoma (*T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. mazzotti*, *T. phyllosoma* y *T. mexicana*) son los de mayor importancia debido a su amplia distribución geográfica y su capacidad de transmisión de *T. cruzi* (Campos *et al.*, 2017).

Uno de los principales problemas en el estudio de la enfermedad es la diversidad en varios aspectos entre las cepas de *T. cruzi*. Antes de los avances de la biología molecular y la genética, las diferencias entre el parásito eran basadas únicamente en las características de crecimiento y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Sin embargo, hoy en día se sabe que *T. cruzi* presenta una gran diversidad biológica, molecular y genética. Por lo cual, actualmente *T. cruzi* se

encuentra dividido en siete Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de la TcI-TcVI y TcBat. La importancia de la caracterización de estas DTU's es debido a que es útil para determinar la ecología evolutiva del parásito en una región, así como para asociar caracteres biológicos con manifestaciones clínicas de la enfermedad. De igual manera, las distintas DTU's pueden causar diferentes patologías y circular en diferentes localidades y ciclos de transmisión, impactando así en los esfuerzos de control, tratamiento y desarrollo de vacunas (Machado y Ayala, 2001; Camacho, 2016).

Debido a que *T. cruzi* es una causa muy importante de morbilidad y mortalidad en América Latina, se han realizado trabajos considerables de caracterización de DTU's en varias regiones de América. Sin embargo, en nuestro país este tipo de trabajos han sido soslayados. Por lo cual, con el presente trabajo se pretende explorar la diversidad genética así como aportar información sobre la presencia, distribución y estructura de las DTU's en los estados de Chiapas y Oaxaca, zonas consideradas como endémicas y con altos porcentajes de prevalencia de la enfermedad. Con esto, se espera coadyuvar a la comprensión de la dinámica de la enfermedad de Chagas y sobre todo a entender las diferencias en el cuadro clínico en el humano.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2. 1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis ocasionada por el parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, este parásito se transmite al ser humano y otros mamíferos principalmente a través de las deyecciones de insectos hemípteros hematófagos, pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (conocidos comúnmente como "chinchas"). Esta enfermedad fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Chagas durante una campaña antimalárica en el estado de Minas Gerais, en donde descubrió la presencia de insectos hematófagos, que habitaban dentro de las viviendas, donde al analizarlos fue

capaz de identificar al parásito, algunos vectores y referir un conjunto de síntomas que el parásito ocasiona al humano. Este descubrimiento fue de gran importancia para la salud pública debido a que esta enfermedad es crónica y a veces hasta mortal, y que a menudo conduce a lesiones debilitantes del corazón y el tracto intestinal. Por lo que actualmente representa la mayor afección por parásitos de las Américas (Ghul, 2009, Herrera, 2016).

A pesar de que actualmente se le ha brindado mayor importancia a la enfermedad esta no es un problema actual para el ser humano, la enfermedad se remonta a miles de años atrás, ya que se ha demostrado que afectaba a poblaciones de humanos prehistóricos a lo largo del continente Americano. Esto ha sido demostrado en estudios hechos sobre momias de hasta 9.000 años de antigüedad, encontradas en la parte norte de Chile y al sur de Perú, donde se encontraron evidencias de la infección chagásica en los humanos. Lo que corrobora la hipótesis de que la enfermedad de Chagas es probablemente tan antigua como la presencia del hombre en el continente (Guhl *et al.*, 2000; Aufderheide *et al.*, 2004).

### **2.1.1 Distribución de la enfermedad de Chagas**

Inicialmente la enfermedad de Chagas se consideraba relacionada al continente Americano, afectando a una población en la que, al igual que otras enfermedades tropicales desatendidas, se centraba en la población más desfavorecida, encontrándose principalmente en las áreas rurales su mayor prevalencia. Sin embargo, hoy en día esto no es así (Briceño y Galván, 2007).

Estimaciones realizadas en 2013 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 6 y 7 millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi* en los 21 países de América Latina (Figura 1). De los cuales dos terceras partes son países pertenecientes al cono sur, en donde los países con más casos estimados serían Argentina, Brasil y México, seguido por Bolivia. Sin embargo, este escenario este aún más complejo debido a los fenómenos de urbanización y globalización de las últimas décadas. Como consecuencia de los crecientes movimientos migratorios, lo que ha favorecido la

presencia de pacientes con la enfermedad de Chagas en todos los continentes, Excepto en África, aunque muy probablemente esto solo sea cuestión de tiempo. Por lo que la enfermedad de Chagas dejó de ser únicamente un problema exclusivo del área rural y una realidad exclusivamente del continente americano (Briceño y Galván, 2007; Hotezet *al.*, 2013).

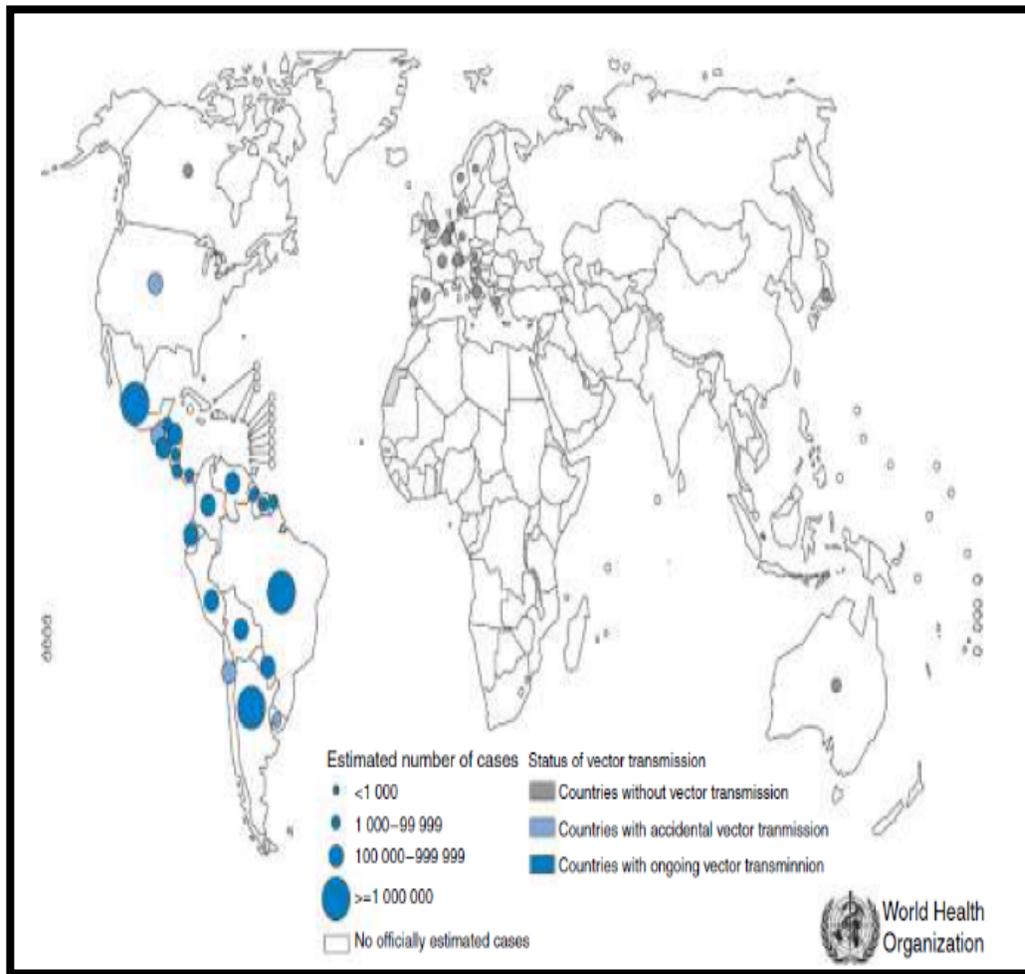


Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en los continentes. Obtenido en: World Health Organization Observatory Map Gallery.

En nuestro país la enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida, en total se tienen 18 áreas consideradas como endémicas para la enfermedad, que incluyen a los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos, donde los estados con mayor número de incidencias de la enfermedad son Jalisco, Oaxaca, Chiapas, Veracruz. El estado de Jalisco es el que registra un mayor número de casos reportados, sin embargo; esto puede deberse a que el resto de los estados cuentan con menos investigaciones debido a la difícil accesibilidad a las comunidades vulnerables a la enfermedad (Dumonteil, 1999; Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

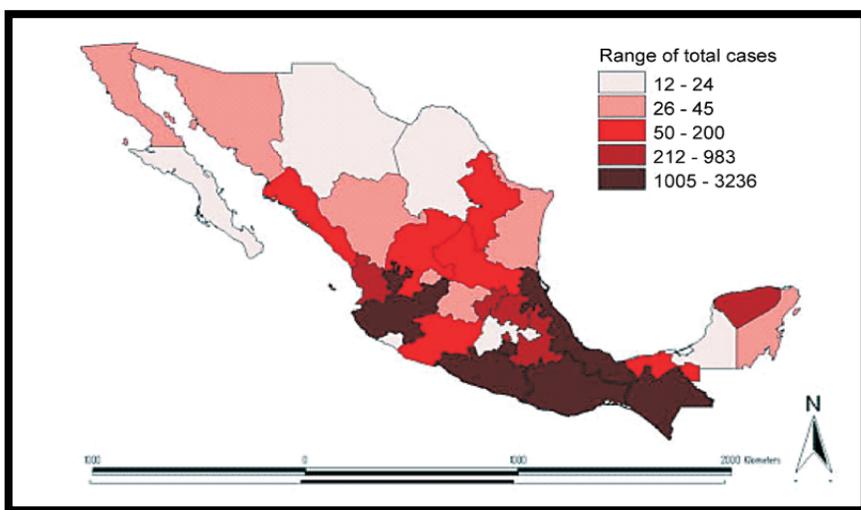


Figura 2. Distribución de Chagas en México. El mapa muestra el rango total de casos de Chagas reportados durante 1928 a 2004. Fuente: Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.

### 2.1.2 Mecanismos de infección

*T. cruzi* se transmite de manera vectorial a través del contacto de las heces de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus*. Con un total de 151 especies de los cuales en México se encuentran 31 especies distintas, de entre ellos 21 se han encontrado que están infectadas de manera natural con el parásito, sin embargo, debido a las características similares podría esperarse que todas puedan ser portadoras de *T. cruzi*. Los insectos de la familia Reduviidae son hematófagos estrictos y principalmente nocturnos, tienen mayor o menor importancia como transmisores de la enfermedad debido a su hábito de defecar mientras se alimentan, este hábito

determina si son buenos o malos transmisores. En la naturaleza las chinches constituyen el principal mecanismo de transmisión en el cual se distinguen tres ciclos: silvestre, doméstico y peridoméstico. En el ciclo silvestre *T. cruzi* circula entre vectores y reservorios silvestres distribuidos en la mayor parte del continente americano desde hace millones de años. Los ecotopos primitivos del parásito son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y atlánticas. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad y característica fauno-florística. El ciclo doméstico se distingue principalmente porque el hombre sobresale como el principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia zonas urbanas y a nuevas regiones y países no endémicos, por lo que el hombre es considerado uno de los últimos reservorios naturales para *T. cruzi*. Por último, en el ciclo peridoméstico intervienen mamíferos como los roedores domésticos, marsupiales, gatos y perros que libremente entran y salen de las residencias, al igual que los triatominos silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por la disponibilidad de alimento, lo que hace que por estos animales este ciclo funcione como una unión entre el silvestre y el doméstico. (Guhl, 2005; Salazar *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2017).

Los otros mecanismos de transmisión que puede presentar *T. cruzi* son por la vía transfusional causada principalmente por la migración de la población rural de áreas endémicas hacia grandes ciudades haciendo que la infección, que había sido primordialmente rural pase a ser urbana y transmisible debido a la transfusión sanguínea. Otra forma de transmisión para el parásito sería la congénita, en este mecanismo el riesgo de transmisión varía según la cepa de *T. cruzi* que mediante lesiones en la placenta puede llegar el parásito al feto; Este tipo de transmisión se notifica con mayor frecuencia en ciudades donde no hay transmisión vectorial, pero a las que han migrado desde el campo numerosas mujeres infectadas en edad de procrear. Por último, otros mecanismos de transfusión pero menos

comunes son los ocasionados por trasplante de órganos, la transmisión oral por comer alimentos contaminados y la accidental mediante accidentes causados por materiales de laboratorio contaminados (Guhl, 2009).

### **2.1.3 Características clínicas y fases de la enfermedad de Chagas**

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir dos fases clínicas: la fase aguda y la fase crónica, siendo esta última subdividida en fase crónica indeterminada y fase crónica determinada (Rassi *et al.*, 2012).

La fase aguda de la enfermedad puede ser asintomática, está se caracteriza por una elevada parasitemia presentándose en el 1% al 2% de los individuos infectados. En esta fase, los parásitos se pueden encontrar en sangre y se evidencia por síntomas tales como fiebre, cefalea, anorexia, mialgia, debilidad, náuseas, vómito, diarrea, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenoparí local o generalizada. La fase aguda generalmente es seguida por un periodo en el que no se presentan síntomas, con una duración variable; lo que puede ocasionar que los pacientes evolucionen a un estado crónico indeterminado, asintomático o a manifestaciones clínicas tales como cardiopatías, megaformaciones o ambos. Entre lo más común es que se presente miocarditis asociadas a arritmias y cardiopatías dilatadas (Toso *et al.*, 2011).

La fase crónica aparece después de la fase aguda, clínicamente es asintomática y puede permanecer latente durante décadas o durante toda la vida del paciente. En esta fase los parásitos (amastigotes) permanecen ocultos y se multiplican principalmente en células de la musculatura cardíaca y digestiva. La infección se puede reactivar con otra enfermedad grave o en condiciones de inmunosupresión severa por trasplante de órganos o SIDA en donde un 30-40% de los pacientes, que tienen entre 10 y 30 años tras la exposición, pueden presentar síntomas de la enfermedad de Chagas, siendo las alteraciones más habituales la cardiopatía y la alteración gastrointestinal (megacolon y megaesófago), así como presentar alteraciones neurológicas (demencia) y con el paso de los años la infección puede causar la muerte súbita o influencia cardíaca

por la destrucción progresiva del musculo cardiaco (Tose *et al.*, 2011; Riera, 2012).

## **2.2 Trypanosoma cruzi**

### **2.2.1 Clasificación taxonómica**

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas y este se clasifica de la siguiente manera:

**Reino:** Protista

**Subreino:** Protozoa

**Sub-phylum:** Mastigophora

**Clase:** Zoomastigophorea

**Orden:** Kinetoplastida

**Sub-orden:** Trypanosomatina

**Familia:** Trypanosomatidae

**Género:** *Trypanosoma*

**Especie:** *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

Todos los miembros del sub-orden Trypanosomatidae están caracterizados por la presencia de un organelo llamado cinetoplasto o kinetoplasto, este corresponde a una condensación de ADN (ADNk), localizado en el interior de la mitocondria. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes debido a que muchas de sus especies afectan a los humanos "*T. cruzi*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodensiense*" (Camacho, 2016).

### **2.2.2 Ciclo de vida**

El parásito *T. cruzi* generalmente completa su ciclo de vida en dos hospederos, uno invertebrado y otro vertebrado. En donde experimenta profundas alteraciones de forma, que, de algún modo, reflejan su adaptación al medio en el que se

localiza. En base a esto y a la morfología celular del parásito, se pueden definir tres formas evolutivas:

**Epimastigote:** *T. cruzi* posee una forma elongada de aproximadamente 20-40 x 2  $\mu\text{m}$ , y el origen del flagelo próximo y el núcleo por delante. Este estadio se desarrolla en el vector, es una de las formas proliferativas del parásito siendo esta la que más fácilmente se puede cultivar “in vitro” (Figura 3) (Toso *et al.*, 2011).

**Tripomastigote:** En esta etapa el parásito presenta una forma elongada (20 – 25  $\mu\text{m}$ ), con el cinetoplasto 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 este estadio es cuando se presenta la forma infectiva y no posee capacidad replicativa. Esta forma se puede encontrar en su hospedero “mamífero” y se denomina (Tripomastigote circulante), de igual manera puede ser ubicado en la ampolla rectal del vector (Tripomastigote metacíclico), (Figura 3) (Toso *et al.*, 2011).

**Amastigote:** *T. cruzi* se encuentra con una forma esférica u ovalada de (2 – 4  $\mu\text{m}$ ), en este estadio el parásito ya carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el hospedero mamífero (Figura 3) (Toso *et al.*, 2011).

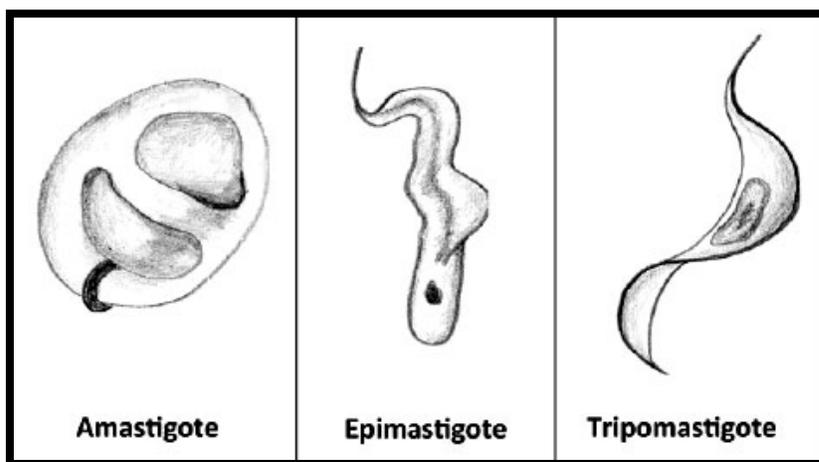


Figura 3. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. (Toso *et al.*, 2011).

### **2.2.3 Reservorios**

Los reservorios de *T. cruzi* son vertebrados mamíferos entre ellos están varias especies de animales selváticos que se han encontrado de manera natural infectados con el parásito abarcando cerca de 73 géneros y 9 órdenes: Didelphimorphia (marsupiales), Cingulata (armadillos), Rodentia (roedores), Carnívora (carnívoros), Artiodactyla (cardos, pecaríes), Chiroptera (Murciélagos), Pilosa (perezosos, osos hormigueros), Lagomorpha (liebres, conejos) y Primata (primates). La importancia epidemiológica de cada reservorio de *T. cruzi* varía según la región geográfica y de acuerdo con la biología y ecología de estos mamíferos y su interacción con los triatomíneos vectores y el hombre. Y si bien, aunque técnicamente todas las especies de mamíferos son susceptibles a la infección, existen algunas con mayor relevancia, esto debido a la capacidad que han demostrado de mantener el parásito circulando en la naturaleza a través del tiempo. Los mamíferos que destacan por ser los hospederos más antiguos del parásito son marsupiales del género *Didelphis*, los osos hormigueros y los perezosos (Acosta y López, 2013).

La importancia de los reservorios radica en que la sangre de los animales infectados, en la cual circula *T. cruzi*, puede servir como fuente de alimento a triatomíneos selváticos que a menudo colonizan sus refugios o áreas circundantes transmitiendo de esta manera la infección a los insectos. Después, las formas adultas de estos triatomíneos selváticos (que poseen una gran capacidad de vuelo), pueden ser atraídas hacia viviendas humanas y de esta manera introducir al parásito al ambiente domiciliario (ídem).

### **2.3 Variación genética de *Trypanosoma cruzi***

El parásito *T. cruzi* es un organismo clonal debido a su mecanismo de reproducción mediante bipartición, sin embargo, esto no significa que no exista una recombinación o que esta se encuentre ausente en las poblaciones naturales del parásito, ni que éste no tenga un impacto en la escala evolutiva, sino que es demasiado raro que se rompa el patrón dominante de clonalidad; por lo que el potencial de intercambio genético en *T. cruzi* está todavía presente entre sus poblaciones. Aunado a esto, *T. cruzi* presenta una amplia variabilidad genética.

Una cepa o aislado de éste corresponde a una población constituida por varios clones, lo que conlleva a diferencias de comportamiento entre los distintos linajes, ya que los organismos pertenecientes a una misma unidad están conformados por cepas que son más similares entre ellas que con el resto de la población; estas cepas o aislados pueden ser identificados por medio de marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos (Duffy, 2010).

### **2.3.1 Nomenclatura de *T. cruzi***

Desde el descubrimiento del parásito la comunidad científica se ha enfocado en su estudio debido a la particularidad de ser una enfermedad altamente distribuida en el continente, partiendo del hecho de que *T. cruzi* presenta una gran variabilidad genética se han intentado caracterizar las cepas de este parásito mediante diversas técnicas. Los primeros pasos en la genética de *T. cruzi* se dieron mediante el uso de un panel de isoenzimas en poblaciones aisladas de diferentes ecotopos de *T. cruzi*. Este estudio fue el pionero en revelar diferencias genéticas entre los parásitos en ciclos de transmisión silvestre y domésticas. Estas variantes descritas fueron denominadas como zymodemas I, II y III, esto abrió el panorama a la investigación sobre la etiología y a los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas, permitiendo estudios comparativos y la influencia de las asociaciones entre huésped, parásito y vector. (Guhl, 2013).

Posteriormente varios autores procedieron a caracterizar aislados del parásito aplicando métodos moleculares como RAPD's PCR - RFLP's, secuenciación de genes y microsatélites, entre otros, dando como resultado que el parásito presenta una amplia variación genética entre los diferentes aislamientos lo que ocasionó una gran confusión entre la comunidad científica sobre la denominación de los diferentes grupos propuestos. Buscando solucionar esta problemática en el año de 1999 se organizó por primera vez un consenso internacional sobre la nomenclatura de *T. cruzi* en donde se acordó la inclusión de dos linajes genéticos diferentes, el linaje TcI como un grupo genético homogéneo y el TcII como un grupo heterogéneo, esto revelado por estudios de isoenzimas y

dimorfismos en el gen miniexón y el dominio divergente del ADRr del parásito (Guhl, 2013).

Los avances más recientes en la nomenclatura de *T. cruzi* se han hecho a través de marcadores moleculares. Estos últimos avances dieron origen a la nomenclatura que hasta el día de hoy se utiliza que son las Unidades Discretas de Tipificación (DTU) los cuales separan a *T. cruzi* en seis genotipos: *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI), aunque de igual forma se plantea la inclusión de un nuevo genotipo recientemente reportado con el nombre de TcBat por su asociación estricta a los murciélagos en Brasil y Panamá, el cual presenta grandes connotaciones evolutivas del parásito de interés (Guhl, 2013).

### **2.3.2 Linajes de *T. cruzi***

Entre los siete diferentes genotipos que actualmente se utilizan en la nomenclatura de *T. cruzi* (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y Tcbat) se encuentran los dos principales (TcI y TcII), a los que se nombran linajes o linajes ancestrales por ser los grupos más antiguos. Estos linajes de *T. cruzi* tienen su origen en relación con su estrecha asociación con la de sus hospederos vertebrados del periodo Cretácico de América del Sur, los cuales estaban conformados principalmente por marsupiales y placentarios ancestrales del orden *Xenarthra* (armadillos, osos hormigueros y perezosos). En donde alguno de estos dos grandes grupos de mamíferos sirvió como reservorio natural del parásito desde entonces. Los distintos ecotópos en donde se desarrollaban estos dos grupos de hospedadores facilitaron la evolución de tipo clonal de dos grupos de parásitos, lo que dio origen a los linajes ancestrales. Se cree que TcI evolucionó en asociación a los mamíferos marsupiales del género *Didelphis* y TcII en relación a los mamíferos terrestres como los armadillos (Briones *et al.*, 1999).

### **2.3.3 Unidades Discretas de Tipificación (DTU)**

El término de Unidad Discreta de Tipificación viene del hecho que *T. cruzi* es una especie que presenta una evolución predominantemente de tipo clonal, con una

cierta cantidad de recombinación genética lo que dificulta las subdivisiones filogenéticas. Por definición, un “clado” representa una unidad evolutiva que está estrictamente aislada de otras unidades evolutivas. Por lo que al poseer híbridos *T. cruzi*; el concepto de clado no le es aplicable para la especie. Sin embargo, incluso cuando ocurre algún intercambio genético, subdivisiones discretas y estables se pueden identificar de forma segura en muchos casos como viene siendo con el parásito (Zingales *et al.* 2009).

El término de “Unidad Discreta de Tipificación” fue propuesto para describir un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa, y que éstas pueden ser identificables por medio de marcadores moleculares o inmunológicos comunes (Muñoz *et al.*, 2013).

Actualmente las poblaciones naturales del parásito se clasifican en siete Unidades Discretas de Tipificación (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y Tcbat), las cuales aparentemente se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatomíneos, hospederos mamíferos y hábitats en distintas áreas geográficas dentro de las Américas (Ceballos, 2010).

Si bien, todas las cepas de *T. cruzi* pueden causar la enfermedad en humanos, cada genotipo (DTU) presentan distintas características

**TcI:** Esta DTU de *T. cruzi*, es el genotipo cuya abundancia y distribución está más extendida en el continente americano, este genotipo se concentra en la infección humana en Centroamérica y Sudamérica. El genotipo está relacionado tanto con ambientes silvestres, como domésticos, siendo en este último más prevalente. Es considerada la causa principal de los casos agudos en humanos y es asociado con el desarrollo de cardiopatías en casos crónicos de la enfermedad (Ceballos, 2010; Guhl, 2013).

**TcII, TcV y TcVI:** Estos genotipos están más asociados a ambientes antrópicos (domésticos), siendo más prevalentes en países del cono Sur de América. Estos genotipos son considerados como la causa de la enfermedad de

Chagas crónica, con manifestaciones cardíacas, megaesófago y megacolon (Ceballos, 2010;Guhl, 2013).

**TcIII y TcIV:** Ambos genotipos se relacionan más con ambientes silvestres, donde a pesar de que las infecciones en humanos por estos genotipos rara vez son documentadas, TcIV es la segunda cepa más prevalente causante de la enfermedad de Chagas. Si bien TcIII no ha sido detectado en infecciones crónicas en humanos, ha sido aislado en perros domésticos de América del Sur (Ceballos, 2010; Guhl, 2013).

**Tcbat:** Esta DTU aún se encuentra en revisión en la inclusión con las otras seis. Solo se ha encontrado asociada con murciélagos y su grupo hermano entre las DTU's es la TcI, se cree que esta interacción entre Tcbat con los murciélagos se debe a la interacción de triatomíneos capaces de interactuar con los murciélagos y mamíferos no voladores, tales como *Panstrongylus* y *Triatoma* (Marcili *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Modelo evolutivo de *Trypanosoma cruzi***

La historia evolutiva de *T. cruzi* aún es muy debatida entre la comunidad científica, actualmente el modelo de evolución clonal es la más aceptada, esta se refiere a que una especie clonal es aquella en donde todos los genotipos multilocus descendientes son prácticamente idénticos al genotipo fundador. El principal parámetro en este modelo es la inhibición de la recombinación genética, por lo que básicamente *T. cruzi* es una especie clonal, sin embargo, el parámetro de clon se refiere a la estructura poblacional y no a su sistema de apareamiento. Hay diferentes métodos de reproducción que pueden generar clones genéticos como la división celular, partenogénesis y ginogénesis. Siguiendo esta definición la endogamia y el selfing no son hipótesis alternativas a la clonalidad, sino más bien un caso particular. El resultado es una falta o una limitación extrema de la recombinación genética, de ahí que a *T. cruzi* se le considere una especie de tipo clonal. Sin embargo, esto no quiere decir que la recombinación genética esté totalmente ausente entre las poblaciones naturales del parásito o que no tenga un impacto en la escala evolutiva, sino más bien que la recombinación genética es

extremadamente raro como para romper el patrón prevaleciente de clonalidad, por lo que el potencial de intercambio genético aun está presente en el parásito (Zingales *et al*, 2012).

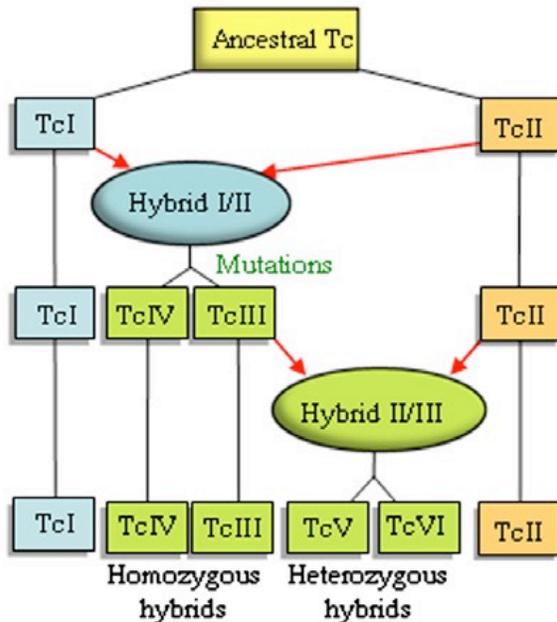
### **2.3.3 Modelos principales de origen de las DTU's**

Para poder definir el origen de las DTU's primero hay que comprender que *T. cruzi* es predominantemente diploide y el método conocido de replicación celular es la fisión binaria, es decir, un proceso de tipo asexual. Bajo el modelo de tipo clonal explicado anteriormente, las DTU's evolucionan con la acumulación de mutaciones discretas, que no se ven afectadas por los eventos raros de intercambio genético, sin embargo, se debe tener en cuenta de que pueden ocurrir algunos eventos de intercambio genético. La evidencia de la heterocigosidad en la naturaleza de *T. cruzi* surgió a través del estudio de genes individuales. Esta Heterocigosidad observada en aislados naturales de TcV y TcVI sugirió que estas DTU's son híbridos y se derivan de TcII y TcIII. Las DTU's restantes TcI, TcII, TcIII, TcIV muestran homocigosidad alélica. Los modelos más nuevos para explicar el origen de las DTU's incorporan eventos de hibridación para explicar la estructura de las poblaciones híbridas existentes.

El primer modelo para explicar la historia evolutiva de las DTU's es el modelo de "Two-Hybridization", en este modelo se menciona que hubo dos eventos de hibridación discretos dando como resultado la formación de las DTU's actuales (I-VI). La fusión entre las cepas de DTU TcI y TcII ancestrales dieron lugar a un híbrido heterocigoto que luego con el tiempo se homogeneizó su genoma para convertirse en un homocigoto progenitor de la DTU TcIV y TcIII. La segunda hibridación que hubo entre las cepas de DTU TcIII y II generaron las DTU V y VI dando como resultado una amplia heterocigosidad. El segundo modelo evolutivo es el de "Three Ancestor", este modelo se tienen tres DTU's ancestrales en donde la DTU TcI no presenta ninguna hibridación y se mantiene, mientras que las DTU TcII y TcIII tuvieron dos eventos de hibridación distintos dando como origen de un evento a la DTU TcV y en el otra a la DTU TcVI. Por lo que básicamente la diferencia de estos modelos radica en que si TcV y TcVI son

progenie de un solo evento de hibridación que incorpora TcI adquiridos de TcIII o solo son progenie de dos (Westenberger *et al*, 2005; Freitas *et al*, 2006; Zingales *et al*, 2012).

### A. Two-Hybridization



### B. Three Ancestor

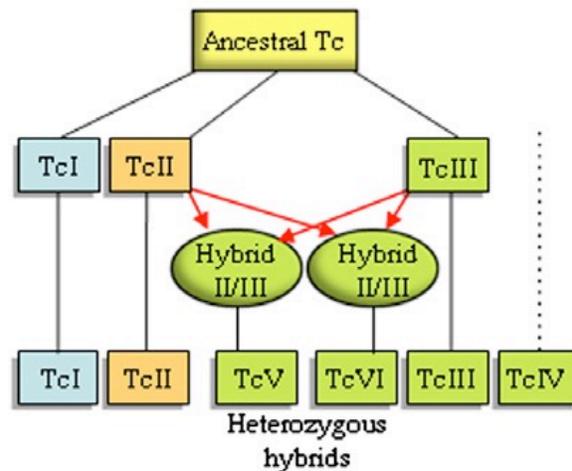


Figura 4. Modelos evolutivo de Two-Hybridization y Three Ancestor que explica las hibridaciones entre DTU's (Zingales *et al* 2012).

#### 2.3.4 Distribución geográfica de las DTU's

Como ya se ha mencionado cada DTU posee características determinadas y de igual manera asociaciones a los distintos ciclos de transmisión. En base a los trabajos de caracterización de aislados y cepas, realizados por varios grupos de investigadores se ha logrado ubicar cada uno de estos genotipos a distintas regiones geográficas del continente americano. Hasta el año 2009, los reportes sobre la distribución geográfica de las DTU's (TcI-TcVI) en el continente mostraban que el TcI se encontraba con una mayor distribución, extendiéndose desde la parte sur de los Estados Unidos de Norte América hasta el norte de Argentina. Para la DTU TcIV ha sido reportada su presencia en la cuenca del Amazonas, TcII está presente desde la cuenca del Amazonas hasta regiones endémicas del sur, mientras TcV y TcVI solo ha sido reportado en países de Sudamérica (Figura 4) (Guhl, 2013; Guzmán, 2015).

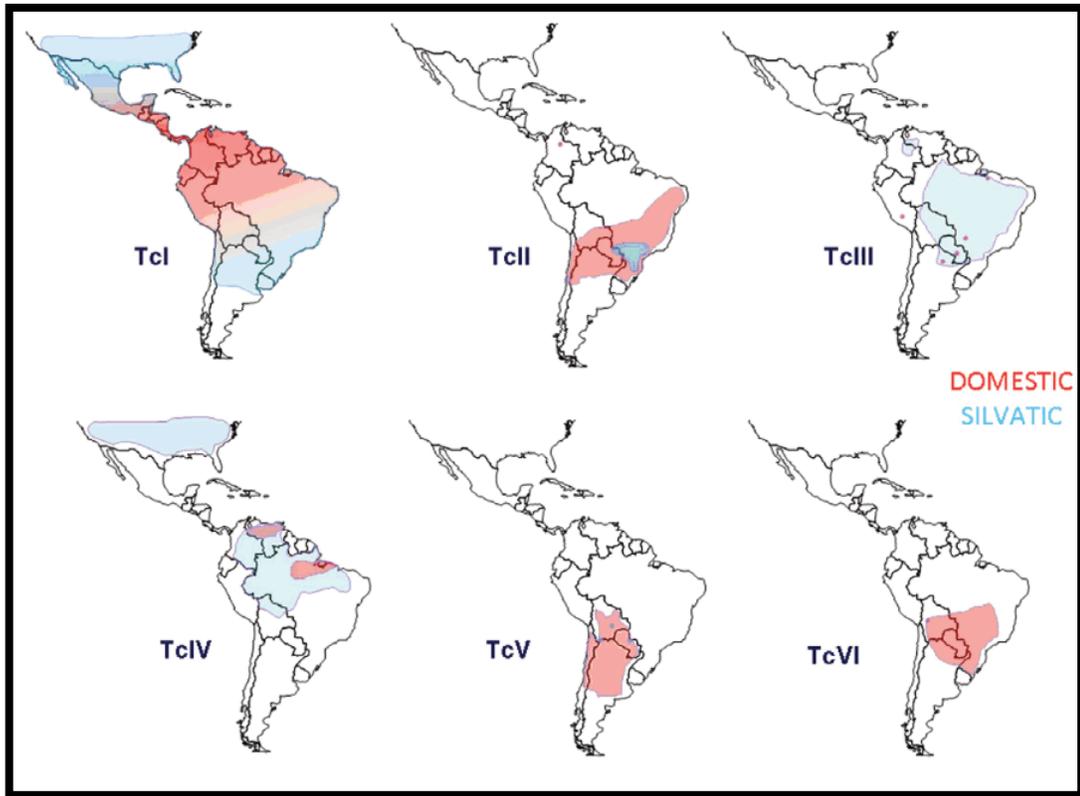


Figura 5. Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con los ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre o doméstico (Guhl, 2013).

Para México a pesar de que se pensaba que había solo la presencia de una DTU (TcI) distribuida por nuestro país, esto era debido a la escasa investigación molecular que se realizaba en el parásito, sin embargo, actualmente se conoce que en México están reportados las seis DTU's a lo largo de nuestro territorio siendo el DTU TcI el más distribuido mientras que las otras cinco DTU se encuentran principalmente distribuidas por la zona centro y sur este del país. En los estados de Oaxaca y Chiapas solo ha sido reportada la presencia de la DTU TcI circulante entre los mamíferos y triatominos de estas regiones (Martínez, 2018).

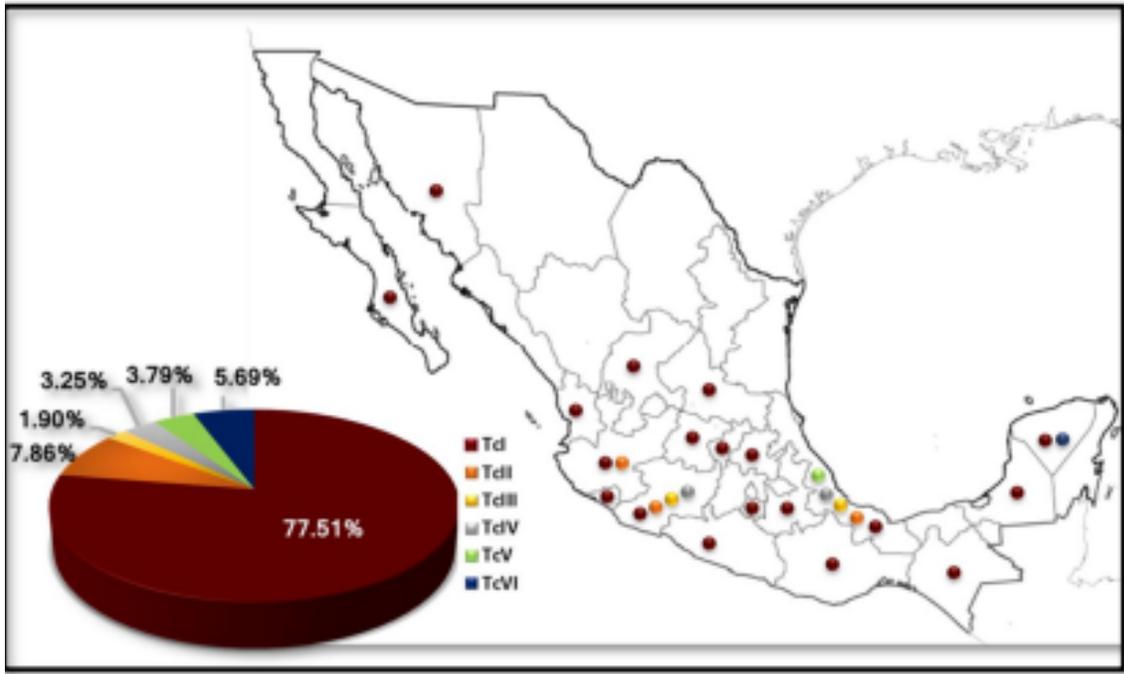


Figura 6. Distribución de las Unidades Discretas de Tipificación de *T. cruzi* en el territorio Mexicano (Martínez, 2018).

### 2.3.5 Importancia del estudio genético de *T. cruzi*

La importancia del estudio sobre la variabilidad genética de cepas o aislados de *T. cruzi* radica en que el rol que juega la diversidad genética en los escenarios clínicos de las diferentes regiones endémicas es aun en gran parte desconocida, sin embargo la heterogeneidad de las cepas y la determinación de un aislado en una de las seis DTU's es útil debido a que constituyen unidades confiables para el análisis de la epidemiología molecular, la determinación de la ecología evolutiva del parásito, así como los factores implicados en las diferentes manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad, por lo que la comprensión de estos conocimientos nos pueden ayudar a la orientación de las nuevas investigaciones y futuras propuestas de control contra la enfermedad de Chagas (Muñoz *et al.*, 2013).

### III. ANTECEDENTES

Desde su descubrimiento, en 1909, del parásito *T. cruzi*, se han llevado a cabo diversos trabajos para intentar dilucidar la dinámica de la enfermedad de Chagas en la naturaleza. Estos trabajos han sido desde aspectos clínicos de la enfermedad; riqueza y abundancia de los insectos vectores, reservorios mamíferos; y en las últimas dos décadas los estudios moleculares y genéticos de *T. cruzi* han tomado una gran importancia. Derivado de lo anterior, se ha observado una amplia diversidad genética en esta especie, lo que conduce a su clasificación en diferentes grupos.

Unos de los primeros intentos de clasificar a *T. cruzi* fue la propuesta por Souto *et al* (1996) en el cual mediante el uso de isoenzimas y dimorfismos en el miniexón, determino dos grupos los cuales fueron establecidos en linajes: *Trypanosoma cruzi* I (TcI) y *Trypanosoma cruzi* II (TcII). A raíz de esto, varios autores procedieron caracterizar aislados del parásito aplicando distintos métodos moleculares como RAPDS's, PCR-RFLPs, secuenciación de genes y microsatélites, entre otros. Como resultado de todo esto se reportó una gran variabilidad genética en los diferentes aislados del parásitos y a su vez esto ocasionó una gran confusión en la denominación de los diferentes grupos ya propuestos con anterioridad (Guhl, 2013).

Para el año de 1999, con el fin de esclarecer estas dudas sobre la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* se estableció por primera vez un consenso internacional de investigadores llamado Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), en donde el tema principal a debatir fue la nomenclatura de *T. cruzi*, en el cual se acordó la inclusión de dos linajes genéticos diferentes *Trypanosoma cruzi* I (TcI) y *Trypanosoma cruzi* II (TcII). Para el 2003 se realizo de nuevo un consenso internacional en donde se propuso dividir a *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación (DTU's) manteniendo al TcI original y subdividiendo al linaje TcII en cinco DTU's (TcIIa- TcIIe), quedando clasificados en seis unidades discretas de tipificación (TcI-TcVI), en donde los dos primeros DTU's "TcI-TcII"

quedaron como los linajes ancestrales y los otros cuatro como poblaciones híbridas de TcII (Zingales *et al* 2009; Zingales, 2011).

Consentino *et al.*, (2012) Establecieron una estrategia simple y rápida para clasificar a *T. cruzi* en siete DTU's (TcI-TcVI y TcBat) mediante la secuenciación de un solo producto de amplificación. Este análisis fue basado en ocho sitios polimórficos discriminantes del gen C-5 esterol desaturasa "TcSC5D", dando como resultado la separación de de las cepas analizadas en cinco grupos que coinciden con las DTU's donde el quinto grupo pertenece a la DTU V y VI, así obteniendo un método rápido, de bajo costo y de fácil empleo para la clasificación de los grupos de *T. cruzi*.

En el estado de Chiapas se realizó la identificación de unidades discretas de tipificación en marsupiales presentes en la reserva ecológica "El Zapotal", en el cual para identificar la prevalencia del parásito se utilizó el gen miniexón y para la identificación de las DTU's utilizaron el gen C-5 esterol desaturasa "TcSC5D", encontrando que entre las tres especies de marsupiales de la reserva existe una circulación de *T. cruzi* perteneciente a el linaje TcI con una prevalencia promedio del 40% (Camacho, 2016).

(Pech-May *et al.*, 2019) analizaron la variación genética en *Triatoma dimidiata* recolectados en comunidades del Istmo de Tehuantepec así como la zona costa y norte de Chiapas; donde aparte de analizar la diversidad de haplogrupos en los triatominos analizaron la infección e identificación de las DTU de *T. cruzi* en 314 ejemplares recolectados en 16 comunidades de Berriozabal Chiapas mediante el uso de la región intergenica del gen miniexón y el gen 18S encontrando que la prevalencia de infección de *T. cruzi* fue de 18.8% y fueron identificadas las DTU TcI y TcVI en los tres haplogrupos detectados de *Triatoma dimidiata*.

Para el estado de Oaxaca Martínez en (2018) realizó la caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de 15 aislados de *T. cruzi* ; en donde para la genotipificación de los aislados realizaron una serie de PCR de

la región intergénica del miniexón, dominio divergente D7 del gen 24S $\alpha$  ARNr y el dominio de tamaño variable del gen 18S ARNr esto con el fin de caracterizar las DTU de los aislados, teniendo como resultado el reporte de tres DTU (TcI, TcII y TcV), siendo la TcI la más predominante y reportando por primera vez en el estado las DTU TcII y TcV.

De igual manera en el 2017 se realizó la caracterización parasitológica de aislados de *T. cruzi* y la actividad de *Triatoma dimidiata* en tres localidades a distintas altitudes, en donde además de analizar lo mencionado se observó la variabilidad genética de los aislados obtenidos a distintas altitudes (300m, 700m y 1400m) mediante el análisis del gen miniexón y el uso de dos cepas control (Cepa Qro y Cepa Y), para la visualización de la amplificación del gen. Dando como resultado que los tres productos de PCR tuvieron un tamaño de amplificación de 350 pb, lo que confirma que los aislados son pertenecientes al mismo linaje evolutivo (TcI) y que no hay diferencias en las DTU's dependiendo de la altitud (De Fuentes, 2017).

Dorn *et al.* (2017) Analizaron la diversidad genética del parásito en centro América desde México hasta Colombia, en donde utilizaron al vector *Triatoma dimidiata* para obtener las muestras de parásitos. Los aislados obtenidos de insectos infectados fueron determinados mediante la comparación de la secuencia de rDNA 18S y la región intergénica líder y comparadas con cepas ya determinadas que se encuentran introducidas en el banco de genes "GenBank", obteniendo como resultado dos DTU's los cuales 94% fueron pertenecientes a TcI y 6% a TcIV. De igual manera se encontró que TcI exhibía una alta variabilidad genética por el cual mediante una prueba Mantel encontrando que la variabilidad era debida por el aislamiento por distancia.

Dario *et al* (2018) Analizaron los triatominos pertenecientes a la selva atlántica de Brasil en donde observaron la prevalencia de *T. cruzi* y al mismo tiempo determinaron molecularmente las DTU pertenecientes de las poblaciones del parásito mediante el uso del gen C-5 esteroles desaturasa "TcSC5D" utilizando secuencias referencias para alineamiento, teniendo como resultado que de las

cinco especies de triatomos encontradas (*Triatoma vitticeps*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus diasi* y *Triatoma tibiamaculata*) solo tres especies estaban infectadas con el parásito y en solo dos lograron determinar las DTU's circulantes, encontrando que en *Triatoma vitticeps* circula las DTU's (TcI, TcII, TcIII y Tc IV) y en *Panstrongylus megistus* circula (TcII y TcIII). De igual manera se observo que la DTU TcII que normalmente solo se encuentra en el ciclo de transmisión domestica, estaba ampliamente distribuida en la naturaleza. Lo que señala que la selva atlántica de Brasil tenga una marcada diversidad genética de DTU.

## **IV. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante marcadores moleculares el linaje y las Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de aislados de *Trypanosoma cruzi* de diferentes localidades de Chiapas y Oaxaca, México.

### **OBJETIVO PARTICULAR**

- I. Determinar mediante la amplificación del gen miniexón los linajes (TcI-TcII) de aislados de *Trypanosoma cruzi* de Chiapas y Oaxaca.
- II. Determinar las Unidades Discretas de Tipificación (DTU) mediante la evaluación de sitios polimórficos del gen C-5 esteroles desaturasa (TcSC5D) de aislados de *Trypanosoma cruzi* de Chiapas y Oaxaca.

## V. ZONA DE ESTUDIO

Los aislados para este trabajo fueron obtenidos de las siguientes localidades, para el estado de Chiapas las localidades fueron: Copainalá, Berriozabal, San Fernando, Tuxtla Gutiérrez, San Juan Cancuc, Ocosingo, Palenque, Taniperla y los mezcales. Para el estado de Oaxaca las localidades fueron: La ventosa, Juchitán, Salina Cruz, Tehuantepec, Magdalena Tequisistlán y Pochutla (Figura 7).

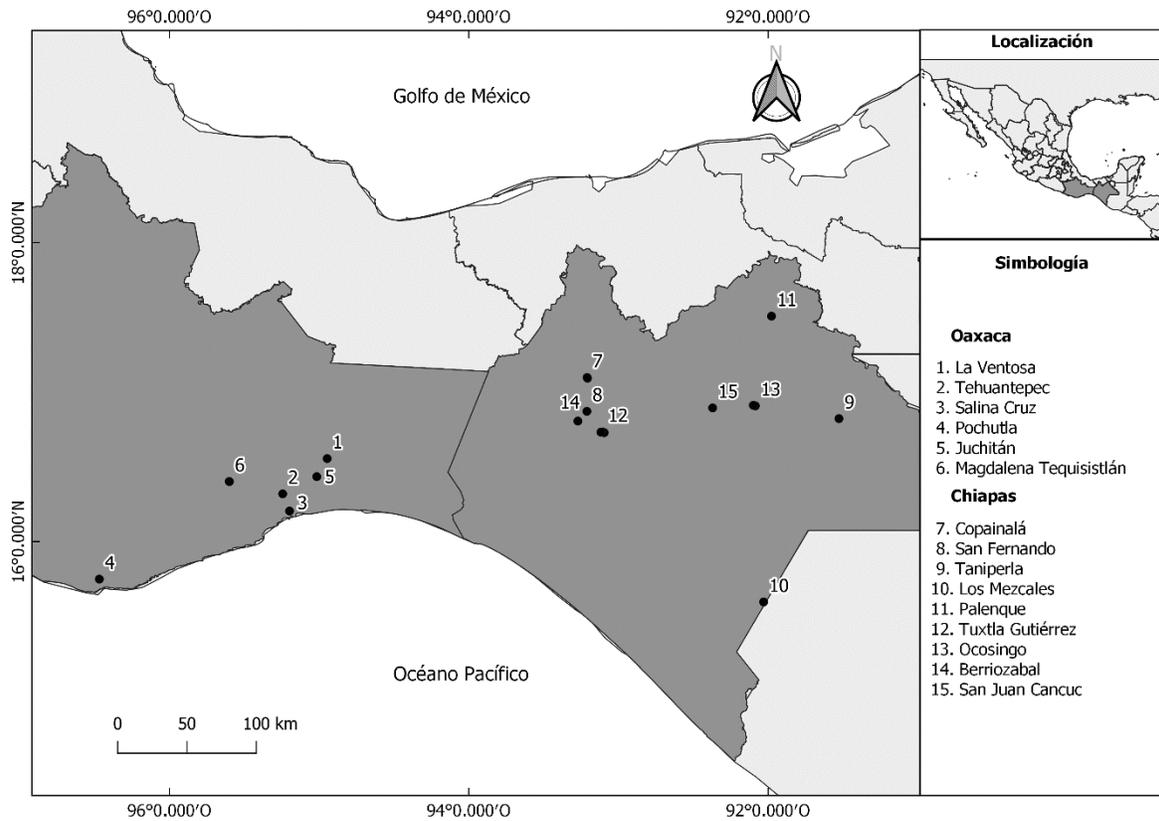


Figura 7. Municipios y localidades de Chiapas y Oaxaca, modificado de Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2015).

El estado de Chiapas se localiza en el extremo suroeste de México, limitando con Guatemala al este y al sur con el océano Pacífico. También colinda al norte y oeste con los estados de Tabasco, Veracruz y Oaxaca. El relieve más eminente del estado, la Sierra Madre de Chiapas cuenta con unos 3000 msnm para la parte más elevada. La vegetación de Chiapas es la segunda más rica de

todos los estados de la república mexicana después de Oaxaca, en esta podemos encontrar bosques con climas templados, selvas tropicales, palmares, manglares y hasta pastizales. La fauna de Chiapas es de las más ricas del país, tan solo en la Selva Lacandona se encuentran el 20% teniendo un total de 1368 vertebrados en el estado (INEGI, 2015).

De igual manera el Estado de Oaxaca se localiza en el extremo suroeste de México, al norte limita con el estado de Puebla y Veracruz, al este con Chiapas, al oeste con Guerrero y al sur con el Océano Pacífico. Oaxaca representa el 4.78% del territorio nacional, su clima puede variar de manera drástica en su regiones. El punto más alto del Estado es el Cerro Yucuyacua con una altitud de 3076 msnm. El estado se distingue por un alto número y porcentaje de endemismo de vertebrados y plantas vasculares, este alberga la mayor riqueza de especies de mamíferos en el país (INEGI, 2015).

## VI. MÉTODOS

### 6.1 Muestras de *T. cruzi*.

Los aislados para este trabajo fueron proporcionados por la facultad de ciencias químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca y el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM), estos aislados fueron obtenidos de *Triatoma dimidiata* recolectados en viviendas de distintas localidades y proporcionadas para este trabajo en medio LIT y en heces de triatominos.

Cuadro 1. Aislados de Trypanosoma cruzi de Chiapas y Oaxaca, México.

<b>Aislado</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Localidad</b>	<b>Estado</b>
ADRIAN	Medio LIT	La ventosa	Oaxaca
ANTONIO	Medio LIT	Tehuantepec	Oaxaca
ADAN	Medio LIT	Salina Cruz	Oaxaca
ELVA	Medio LIT	San Pedro Pochutla	Oaxaca
T01	Heces	Juchitán de Zaragoza	Oaxaca
Tequis1	Heces	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
Tequis3	Heces	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
Tequis4	Heces	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
ITRI	Medio LIT	Copainalá	Chiapas
RATÓN	Medio LIT	San Fernando	Chiapas
TEHUATITLA	Medio LIT	Taniperla	Chiapas
PHYLOSOMA	Medio LIT	Los mezcales	Chiapas
VICTOR	Medio LIT	Palenque	Chiapas
TUXTLA	Heces	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
OCOSINGO 1	Heces	Ocosingo	Chiapas
OCOSINGO 2	Heces	Ocosingo	Chiapas
ZAPOTAL	Heces	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
Tx2	Heces	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
CO1	Heces	Copainalá	Chiapas
Berriozabal	Heces	Berriozábal	Chiapas
San Juan	Heces	San Juan Cancuc	Chiapas

## 6.2 Extracción de ADN por método de gradiente de sales.

Tanto para las muestras en medio LIT (ADRIAN, ADAN, ANTONIO, RATON, PHYLOSOMA, ELVA, ITRI, VICTOR, TEHUATITLA) como para las muestras obtenidas directo de las heces de *Triatoma dimidiata* (OCOSINGO 1, OCOSINGO 2, TO1, ZAPOTAL, Tequis 1, Tequis 3, Tequis 4, Tx2, CO1 Berriozabal y San Juan) se utilizó el protocolo modificado de Sunnucks y Hales (1996); Aijanabi & Martinez (1997), el cual consiste en 4 días de trabajo.

Día uno: Se utilizaron tubos nuevos de micro centrifuga de 1.5 ml el cual se añadieron 300 microlitros de buffer TEN (EDTA, NaCl, SDS, Tris HCl y protainasa K) + SDS 2%, se añadió 20 microlitros de muestra y 10 microlitros de protainasa

K. Los tubos se pasaron por vortex durante 20 segundos. Y por último fueron incubados en bloque seco de calor durante 12 horas a 56°C.

Día dos: Las muestras fueron retiradas del bloque seco de calor y se esperó a que se encontraran a temperatura ambiente. A los tubos se le añadió 100 microlitros de cloruro de sodio (NaCl) 5M y se pasaron por vortex durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron durante 8 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Al terminar, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos rotulados de 1.5 ml y se añadieron 800 microlitros de etanol absoluto frío (-20°C), Todos los tubos fueron invertidos de 4 a 7 veces para homogenizar el sobrenadante y el etanol y se dejaron reposar durante 12 horas a -20°C.

Día tres: Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Al terminar se decantó el exceso de etanol en un vaso de precipitado cuidando de no derramar el pellet. Se añadieron 800 microlitros de etanol frío (-20°C) al 70% y se centrifugó durante 8 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Al finalizar se decantó el exceso de etanol y se dejó secando los tubos durante 12 horas para evaporar todo el etanol.

Día cuatro: Una vez secas las muestras se añadieron 100 microlitros de agua destilada estéril y fueron almacenadas a -20°C para su posterior uso.

Una vez listas las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la presencia de ADN en cada muestra y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

### **6.3 Determinación de linajes ancestrales TcI y TcII de *T. cruzi* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la determinación de los linajes ancestrales TcI y TcII se amplificó un fragmento de la región intergénica del gen miniexón el cual discrimina en dos linajes según el tamaño del fragmento. En cepas del linaje TcI se obtiene un fragmento de 300 pb, mientras que para el linaje TcII se obtiene un fragmento de 350 pb. Se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Souto *et al.* (1996)

(Cuadro 2), siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM) para la amplificación, el cual consiste en utilizar 16.8 µl agua libre de nucleasas (Promega), 5 µl de Mytaq reaction buffer 5x (Bioline), 1 µl de cada oligonucleótido, 0.2 µl de Mytaq DNA polimerase (Bioline) y 1 µl de ADN. El programa de amplificación que se utilizó fue: desnaturalización inicial a 94°C/4:30 min, 26 ciclos de desnaturalización a 61°C/40 segundos, alineamiento a 72°C/1 min, extensión 72°C/1 min, y una extensión final de 72°C/5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb para determinar el tamaño de los fragmentos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz UV para su determinación.

### **6.3.1 Determinación de las unidades discretas de tipificación (DTU) de *T. cruzi* basado en la amplificación por PCR del fragmento del gen c-5 esteroles desaturasa (TcSC5D)**

Para la identificación de las DTU, se amplificó un fragmento del gen c-5 esteroles desaturasa utilizando los oligonucleótidos TcSC5DF y TcSC5DR (Cuadro 2) y siguiendo los protocolos de amplificación reportados por Cosentino *et al.*,(2012).

Todos los productos de amplificación de las DTU's se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb para determinar el tamaño de los fragmentos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador.

Los productos de amplificación obtenidos de la PCR se secuenciaron bajo el método de Sanger en la compañía biotecnológica "Macrogen, Inc" con sede en Seúl, Corea del Sur.

Cuadro 2. . Oligonucleótidos para los genes miniexón y TcSC5D reportados por Souto *et al.* (1996) y Cosentino *et al.* (2012).

Oligonucleótidos	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón	Referencia
Tc	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG		(Souto <i>et al.</i> , 1996).
Tcl	GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC	350 pb	
Tcll	CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G	300 pb	
TcSC5DF	GGACGTGGCGTTTGATTTAT	832 pb	(Cosentino <i>et al.</i> , 2012).
TcSC5DR	TCCCATCTTCTTCGTTGACT		

### 6.3.2 Análisis de secuencias de genes del gen c-5 esteroles desaturasa para la determinación de DTU

Las secuencias que se obtuvieron de la secuenciación fueron comparadas en el programa Nucleotide BLAST versión (2.2.25), esto con el fin de comprobar si las secuencias obtenidas eran pertenecientes a *T. cruzi*. Para el análisis las secuencias obtenidas fueron alineadas bajo un alineamiento múltiple (MUSCLE) en el programa Mega X con secuencias referencias obtenidas del banco de genes de NCBI "Genbank" reportadas por (Cosentino *et al.*, 2012). Una vez alineadas tanto las secuencias referencias como las secuencias problema se buscaron ocho sitios polimórficos únicos (SNP) en las posiciones: 138, 168, 336, 495, 618, 657 y 747. Por último se compararon estos sitios con el cuadro de sitios polimórficos reportado por Cosentino *et al.*, 2012 (figura 7) para determinar las DTU's de las secuencias problema.

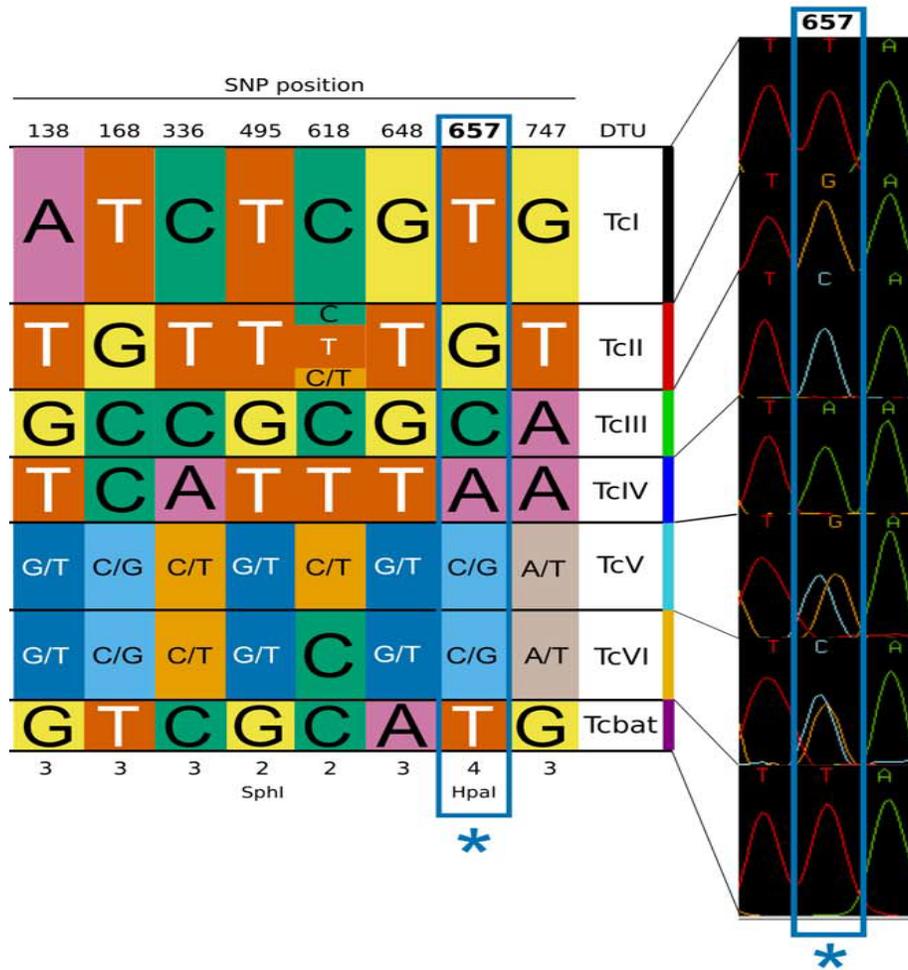


Figura 8. Sitios polimórficos claves para la identificación de DTU's con el gen C-5 esteroI desaturasa (Consentino et al, 2012).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Determinación de linajes ancestrales TcI y TcII de *T. cruzi* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En la amplificación de los linajes de *T. cruzi* se utilizó el gen miniexón con los controles positivos Mp/Qro (TcI-350pb) y Cepa Y (TcII-300pb). Con este análisis se logró la determinación de casi todos los aislados con excepción de: TO1, Zapotal, Tequis 4, Tx2 (Figura 8), obteniendo una mayor circulación del linaje TcII en los 17 aislados identificados (cuadro 3).

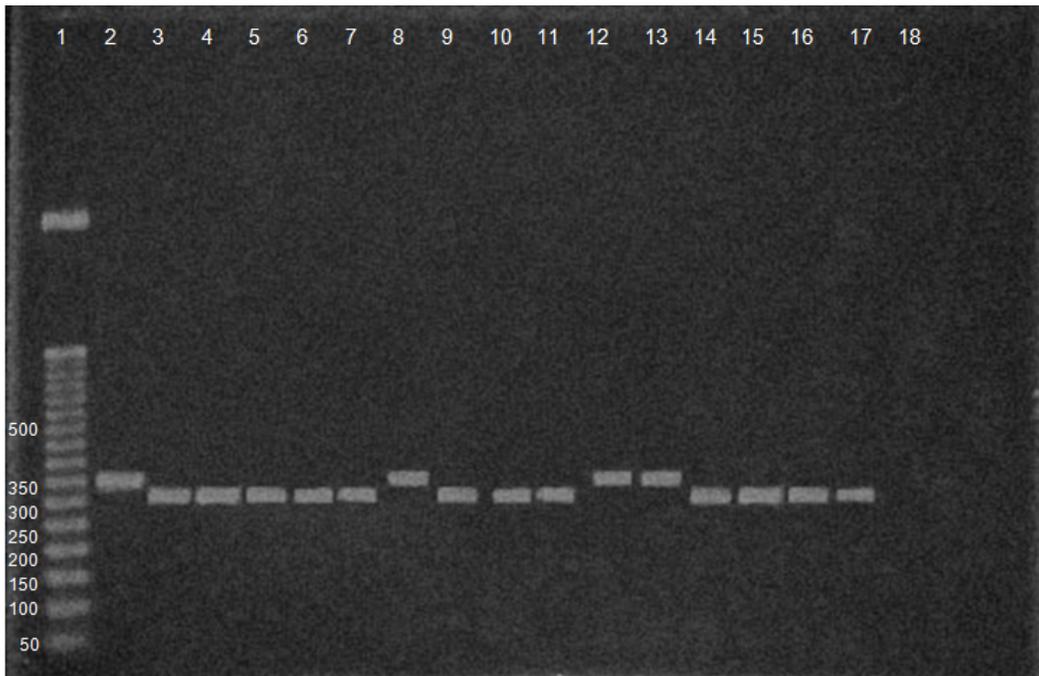


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen miniexón: Pozo 1 marcador de peso molecular de (50pb), pozo 2 Mp/Qro (350pb), pozo 3 cepa Y (300pb), pozo 4 ADRIAN (300pb), pozo 5 ADAN (300pb), pozo 6 ANTONIO (300pb), pozo 7 RATON (300pb), pozo 8 PHYLOSO

Cuadro 3. Determinación de linajes de aislados de *Trypanosoma cruzi*.

Aislados	Tamaño de amplificación (Pb)	Linaje
<b>Mp/Qro</b>	350	Tcl
<b>Cepa Y</b>	300	TcII
<b>ADRIAN</b>	300	TcII
<b>ADAN</b>	300	TcII
<b>ANTONIO</b>	300	TcII
<b>RATON</b>	300	TcII
<b>PHYLOSOMA</b>	350	Tcl
<b>ELVA</b>	300	TcII
<b>ITRI</b>	300	TcII
<b>VICTOR</b>	300	TcII
<b>TEHUATITLA</b>	350	Tcl
<b>TUXTLA</b>	350	Tcl
<b>OCOSINGO 1</b>	300	TcII
<b>OCOSINGO 2</b>	300	TcII
<b>Tequis 1</b>	300	TcII
<b>Tequis 3</b>	300	TcII
<b>CO1</b>	350	Tcl
<b>Berriozabal</b>	350	Tcl
<b>San Juan</b>	350	Tcl

### 7.1.1 Amplificación del gen C-5 esterol desaturasa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con la amplificación del gen c-5 esterol desaturasa se obtuvieron solo 11 amplificaciones de los 21 aislados analizados (Figura 9) a un tamaño de pares de bases entre 800 y 900 como lo reportado por Consentino *et al* (2012) de 832 pb (figura 10).

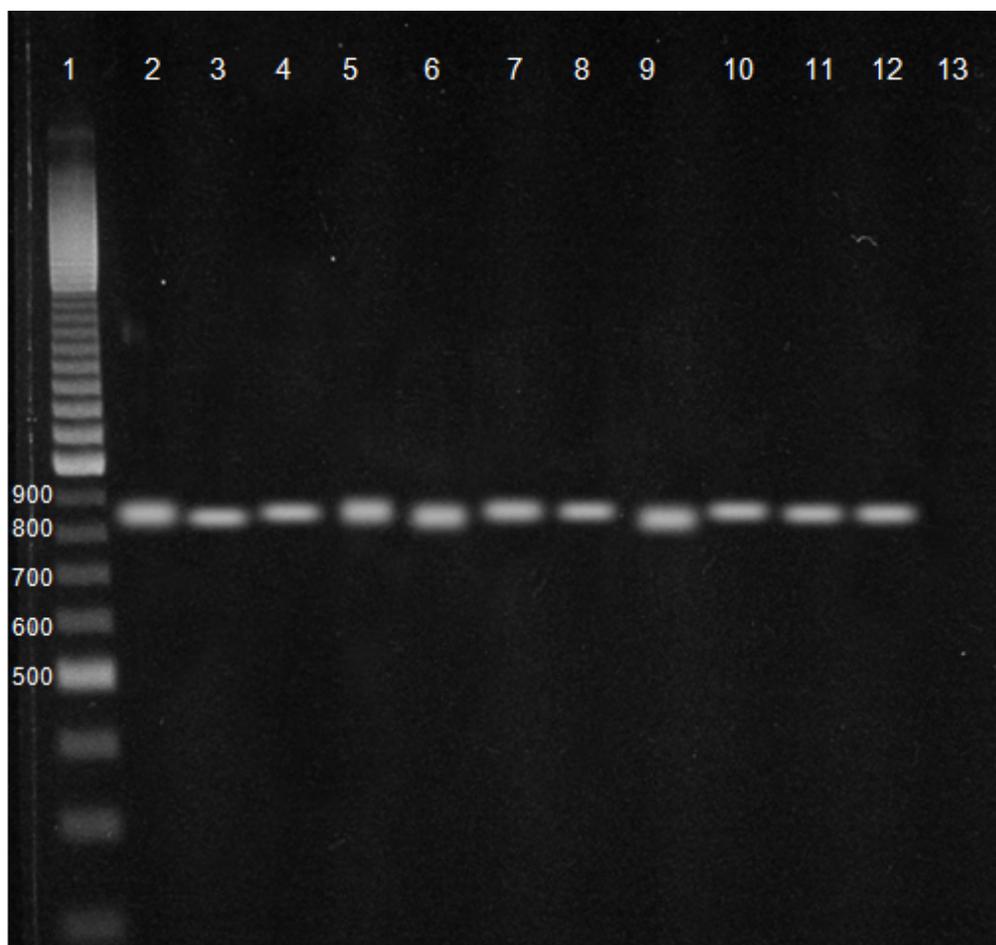


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen C-5 sterol desaturase: Pozo 1 marcador de peso molecular de (100pb), pozo 2 Mp/Qro (800pb), pozo 3 Tuxtla (800pb), pozo 4 ADRIAN (800pb), pozo 5 ADAN (800pb), pozo 6 ANTONIO (800pb), pozo 7 RATON (800pb),

### 7.1.2 Determinación de las de Unidades Discretas de Tipificación.

Los productos de amplificación del gen C-5 esterol desaturasa fueron secuenciados en la compañía biotecnológica “Macrogen, Inc”. Las secuencias obtenidas fueron alineadas juntos con secuencias referencias reportadas por Consentino *et al.*, (2012). Una vez alineadas se buscaron ocho sitios polimórficos en las posiciones (138, 168, 336, 495, 618, 648, 657 y 747) de los aislados y fueron comparadas con las secuencias referencias obteniendo cuatro aislados pertenecientes al DTU TcI (ANTONIO, ELVA; TUXTLA, Tequis 1), seis al DTU TcII (ADRIAN, ADAN, RATON, TEHUATITLA, PHYLOSOMA, VICTOR) y solo un aislado (Tequis 3) perteneciente a la DTU TcIV (cuadro 4).

Cuadro 4. Sitios polimórficos de aislados de *T. cruzi*.

Aislado de <i>T. cruzi</i>	Posición del nucleótido								DTU
	138	168	336	495	618	648	657	747	
Mp/ Qro	A	T	C	T	C	G	T	G	Tcl
ANTONIO	A	T	C	T	C	G	T	G	Tcl
ELVA	A	T	C	T	C	G	T	G	Tcl
TUXTLA		T	C	T	C	G	T	G	Tcl
Tequis 1	A	T	C	T	C	G	T	G	Tcl
ADRIAN	T	G	T	T	C	T	G	T	Tcll
ADAN	T	G	T	T	C	T	G	T	Tcll
RATON	T	G	T	T	C	T	G	T	Tcll
TEHUATITLA	T	G	T	T	C	T	G	T	Tcll
PHYLOSOMA	T	G	T	T	C	T	G	T	Tcll
VICTOR				T	C	T	G	T	Tcll
Tequis 3	T	C	A	T	T	T	A	A	TclV

En total se logró la determinación de las DTU de 17 aislados de los 21 analizados. Se obtuvieron seis aislados identificados para el estado de Oaxaca pertenecientes a las DTU (Tcl, Tcll y TclV) y 11 para el estado de Chiapas (Tcl y Tcll) (Cuadro 5) (Figura 11).

Cuadro 5. Unidades discretas de tipificación identificadas de los aislados de *T. cruzi* de Chiapas y Oaxaca.

<b>Aislado</b>	<b>DTU</b>	<b>Localidad</b>	<b>Estado</b>
ADRIAN	TcII	La ventosa	Oaxaca
ANTONIO	Tcl	Tehuantepec	Oaxaca
ADAN	TcII	Salina Cruz	Oaxaca
ELVA	Tcl	Pochutla	Oaxaca
T01	No definida	Juchitán de Zaragoza	Oaxaca
Tequis1	Tcl	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
Tequis3	No definida	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
Tequis4	TcIV	Magdalena Tequisistlán	Oaxaca
ITRI	TcII	Copainalá	Chiapas
RATÓN	TcII	San Fernando	Chiapas
TEHUATITLA	TcII	Taniperla	Chiapas
PHYLOSOMA	TcII	Los mezcales	Chiapas
VICTOR	TcII	Palenque	Chiapas
TUXTLA	Tcl	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
OCOSINGO 1	TcII	Ocosingo	Chiapas
OCOSINGO 2	TcII	Ocosingo	Chiapas
ZAPOTAL	No definida	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
Tx2	No definida	Tuxtla Gutiérrez	Chiapas
CO1	Tcl	Copainalá	Chiapas
Berriozabal	Tcl	Berriozabal	Chiapas
San Juan	Tcl	San Juan Cancuc	Chiapas

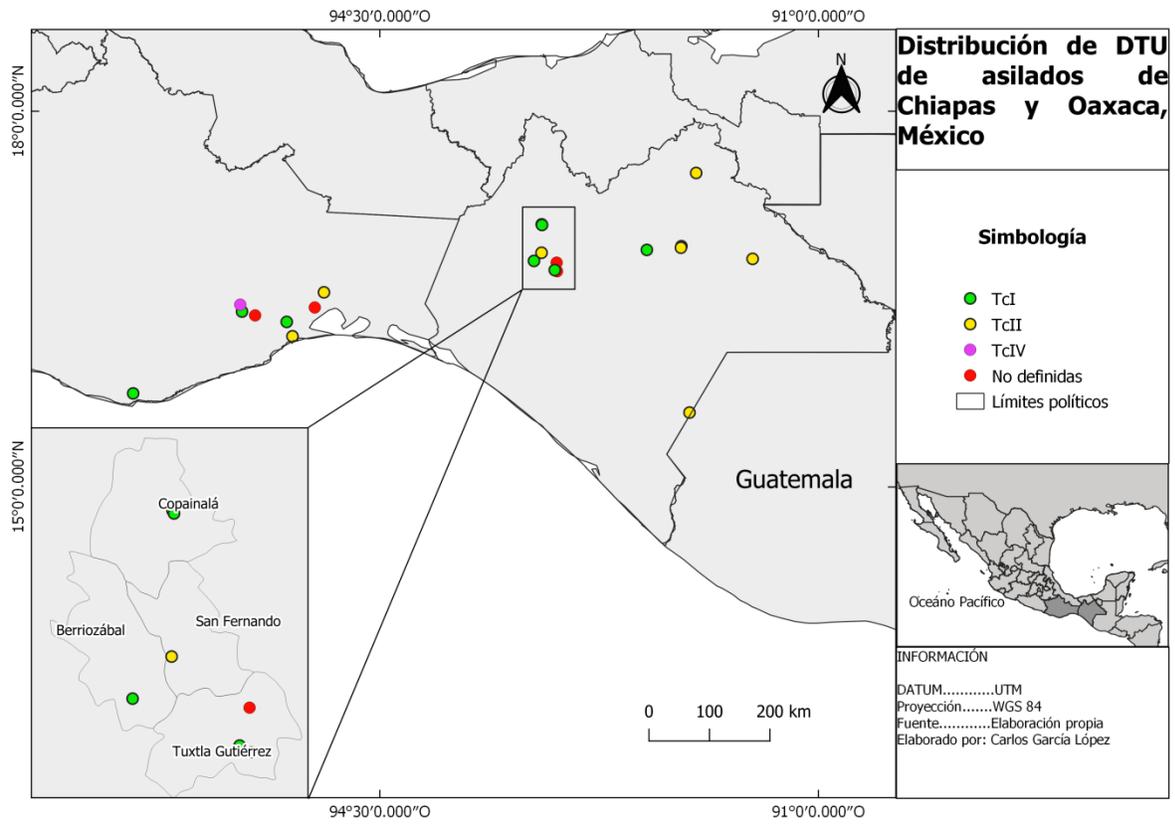


Figura 11. Distribución de DTU's de aislados en las localidades de Chiapas y Oaxaca, México.

## VIII. DISCUSIÓN

En la actualidad se sabe que *T. cruzi* es un parásito muy diverso genéticamente, por lo que actualmente se encuentra dividido en siete genotipos denominados Unidades Discretas de Tipificación (Por sus siglas en inglés: Discrete Typing Units). Entre estos genotipos se encuentran las DTU TcI y TcII que son reconocidos como los genotipos principales de *T. cruzi* y denominados como linajes ancestrales debido a que son los genotipos más antiguos y los que dieron origen a las DTU's actuales (Zingales *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se analizó un total de 21 aislados de *T. cruzi* para determinar los linajes ancestrales mediante la amplificación de la región intergénica del miniexón, con lo cual se obtuvo la identificación de 17 aislados. Los aislados que no se lograron identificar mediante este gen fueron Zapotal, Tx2, TO1 y Tequis 4, los cuales fueron obtenidos directamente de las heces de triatomíneos. De acuerdo con Mejía y Triana (2005), la s

De manera por el cual posiblemente no se logró la amplificación del gen pueda deberse a que los oligonucleótidos utilizados para el trabajo poseen una baja sensibilidad a la detección del parásito en muestras obtenidas directamente de heces de triatomíneos tal como nos menciona Mejía Ana y Triana Omar (2005) en donde detectaron que la sensibilidad de los marcadores de la región intergenica del miniexón Tc, TcI y TcII son un 42.5% menos sensible a detectar *T. cruzi* a comparación de los marcadores de la región de kDNA (S35 y S36) en muestras obtenidas directamente de sangre de ratones y heces de triatomíneos. Por lo que recomiendan que para aumentar la eficacia de los marcadores de miniexón es necesario que el parásito pase antes de realizar una extracción de ADN a un hospedero como el ratón o un medio de cultivo óptimo como el medio LIT, esto con la finalidad de aumentar la cantidad de parásitos y así mejorar la sensibilidad de los marcadores.

En los aislados en los que se logró la identificación de los linajes se observó una mayor circulación de TcII teniendo un total de 11 aislados pertenecientes a

este linaje y solo seis a TcI. Todos los aislados del estado de Oaxaca fueron pertenecientes al linaje TcII mientras que en Chiapas seis aislados fueron TcI (Tehuatlita, Phylosoma, Tuxtla, CO1, Berriozabal y San Juan) y cinco TcII (Itri, Raton, Victor, Ocosingo 1 y Ocosingo 2) (Cuadro 3). Zingales *et al.*, (2012) nos menciona que la importancia de estos dos genotipos de *T. cruzi* es a causa de que estos fueron los que originaron a las DTU's actuales, principalmente el linaje TcII es de gran interés ya que este linaje está ampliamente relacionado al ciclo domestico de la enfermedad siendo la causa primaria de la enfermedad de Chagas, principalmente de casos de megasindromes digestivos y cardiopatías en la región Este y central de Brasil por lo que en las localidades donde está presente este linaje se podría esperar que los triatomíneos se encuentren bien adaptados al ciclo doméstico y peridoméstico de la enfermedad. Sin embargo, no hay que tomar con menos importancia la DTU TcI debido a que esta es la que se encuentra más distribuida en todo el continente Americano, de igual manera el analisis de TcI es de interés debido a que en estudios recientes realizados en Colombia por Villa *et al.*, (2013) encontraron que dentro de esta DTU se encuentran dos genotipos claramente diferenciados denominados TcI doméstico (asociado a *R. prolixus*) y TcI selvático (asociado a ejemplares silvestres de *R. pallens* y *R. colombiensis*), en donde el genotipo selvático de TcI se ha asociado a casos agudos de transmisión vectorial en áreas selváticas y en casos de transmisión por ingesta de alimentos contaminados, por lo que es muy importante confirmar en estudios posteriores si en las localidades donde se reportó la presencia de TcI se encuentran presentes estos genotipos lo cual permitiría obtener información sobre la epidemiología de *T. cruzi* en Chiapas y Oaxaca y así poder confirmar si eventuales casos de la enfermedad de Chagas aguda en estos estados podrían estar relacionados al genotipo silvestre de TcI.

Para la identificación de las DTU's con el gen C-5 esteroles desaturasa se analizaron un total de 21 aislados obtenidos de distintas localidades de Chiapas y Oaxaca, de los cuales solo se obtuvieron la amplificación y las secuencias de 11 aislados, con la comparación de los sitios polimórficos de las secuencias de cada

aislado se identificaron tres DTU TcI, TcII y TcIV. En el estado de Chiapas se encontraron las DTU (TcI y TcII) con una mayor presencia de TcI, mientras que para el estado de Oaxaca casi todos los aislados fueron TcII con un solo reporte de TcIV (cuadro 4). Un caso a destacar al momento de obtener los resultados del análisis del gen C-5 esterol desaturasa fue que en varios aislados que ya habían sido identificados con el gen miniexón dieron resultados diferentes como lo son el aislado Antonio, Elva, Tequis 1 que con el gen miniexón amplificaron para TcII mientras que para el análisis de las secuencias del gen C-5 esterol desaturasa dio como resultado TcI, de la misma forma pasó con los aislados Tehuatitla y Phylosoma que de dar como resultado TcI del análisis de miniexón paso a TcII con el gen C-5 esterol desaturasa. Este tipo de errores al momento de comparar ambos análisis nos lo cita Consentino *et al* (2012) en donde nos menciona que a pesar que los análisis basados en diferencias de patrones electroforéticos logran discriminar todos las DTU, estas son muy propensas a errores al momento de la interpretación de los datos debido a que la discriminación para la identificación de las DTU se basa en la inspección visual de estas bandas de electroforesis, por el cual el análisis de las secuencias de el gen C-5 esterol desaturasa dan resultados inequívocos al momento de discriminar los genotipos de cada DTU de *T. cruzi*.

A pesar de la importancia que tiene el conocer las DTU's es poco lo que se sabe actualmente en nuestro país. Por muchos años se creía que en México la única DTU que circulaba era la TcI (Guhl, 2013). Sin embargo, estudios más recientes ya reportaron las DTU's restantes con excepción de Tcbat. Pese a que los avances en la identificación de las DTU en nuestro país ya han avanzado esta información sigue siendo muy escasa. En el estado de Chiapas Camacho (2016) reporto la presencia de TcI y Petch.May *et al.*, (2019) reportaron las DTU's TcI y TcVI. Mientras que en Oaxaca solo había sido reportado las DTU's TcI, TcII y TcV por Martínez (2019), por lo que con nuestros resultados en donde se obtuvo la identificación de tres DTU TcI, TcII y TcIV (Figura 11) se obtienen nuevos registros para Chiapas con TcII y Oaxaca con TcIV, teniendo así en estos dos estados la presencia de cinco de las siete DTU's.

Todos los aislados obtenidos en el trabajo fueron obtenidos de *Triatoma dimidiata* obteniendo la identificación de tres DTU's TcI, TcII, y TcIV, esta relación entre DTU's y *T. dimidiata* ha sido encontrado también por (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013) en donde identificaron TcI en la península de Yucatán. En el estado de Oaxaca, en la localidad de Magdalena Tequisistlan se encontró las DTU's TcI y TcIV estos genotipos de *T. cruzi* están relacionados por sus características clínicas provocadas en el humado. Sin embargo, diferenciados por los ciclos de transmisión donde TcI se encuentra más relacionado a los ciclos domésticos y peridomesticos, mientras que TcIV está mayormente relacionado con el ciclo selvático de la enfermedad, estos mismos genotipos fueron reportados por (Dorn *et al.*, 2017) en *T. dimidiata* en la localidad de Benito Juárez, Quintana Roo, en donde hace mención a que en esta localidad se encuentra en una estrecha relación con la enfermedad de Chagas debido a estos dos genotipos lo cual ocasiona que las localidades que poseen más de un genotipo estén propensas a un riesgo mayor debido a que al tener distintas DTU's pueden dificultar el desarrollo de vacunas y a la mejora del tratamientos, ya que si las poblaciones de *T. cruzi* son diferentes éstas responden de distintas formas a los medicamentos; Lo cual ocasiona que la mejor forma de controlar la enfermedad sea mediante el vector y no por el parásito.

## IX. CONCLUSIÓN

De los 21 aislados se logró la identificación de 17 mediante el uso del gen miniexón obteniendo una mayor circulación del linaje TcII. Sin embargo, este análisis es poco confiable a comparación de la identificación mediante los sitios polimórficos del gen C-5 esteroles desaturasa. Con este gen se identificaron 17 aislados pertenecientes a TcI, TcII en el estado de Chiapas y TcI, TcII y TcIV en el estado de Oaxaca obteniendo que en estos dos estados poseen una gran variación de DTU's circulando entre el vector *Triatoma dimidiata* y en el ciclo domestico de la enfermedad.

## VII. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Augusto-Pinto, L., Teixeira, S., Machado, D. 2003. Support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *genetics*. 164: 117–126.
- Acosta, N. y López, E. 2013. Reservorios mamíferos del *Trypanosoma cruzi* en Paraguay. Memorias del Instituto de investigaciones en ciencias de la salud. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay. Pp. 90-96.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Lorentz, E., Wittmers, Jr., Fornaciari, G., Allison, M. 2004. A 9,000 year record of Chagas disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 2034-2039.
- Briseño-León, R. y Galván, J. M. 2007. The social determinants of Chagas disease and transformation of Latin America. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 102. Pp 109-112.
- Briones, M. R. S., Souto, R. P. y Stolf, B. S. 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Elsevier*. 104: 219–232.
- Camacho-Sierra, L. 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. Universidad Autónoma Del Estado De México. México D.F.*
- Antonio, A., Rubio, M. Itandehui, T. Hernández, L. Martínez, S. Manning, R. 2017. Enfermedad de Chagas: vectores. *Revista Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*. 68: 30-33.

- Ceballos, L. 2010. Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
- Cura, C., Schijman, A. 2013. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Revista española de salud pública*. 86: 9-16.
- Cruz-Reyes, A. y Pickering-López, J. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-A review. *Memorias del instituto Oswaldo Cruz*. México D.F. Pp. 345–54.
- Cosentino, R. O. 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):1-11.
- De Fuentes-Vicente, J. A. 2017. Caracterización parasitológica de aislados de *Trypanosoma cruzi* y actividad fenoloxidasa de *Triatoma dimidiata* de tres localidades a distintas altitudes en el estado de Chiapas, México. Tesis de doctorado. Facultad de medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.
- Duffy, T. 2010. Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias exactas y naturales. Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
- Dorn, P., McClure, A., Gallaspy, M., Waleckx, E., Woods, A., Monroy, M., Stevens, L. 2017. The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central America vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(9): e0005878.
- Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas disease in Mexico. *Salud Publica Mexicana*. 41(4): 322–327.
- Espinoza, M. y García, M. 2003. Manual de laboratorio de genética. ECOSUR- San Cristóbal de las Casas. El Colegio de la Frontera Sur. (ECOSUR). 12 Pp.

- Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L. Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M.R. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi* VI CL Brener. PLoS Pathogens 2: 226-235.
- Guhl, F., Jaramillo, G., Vallejo, A., Cárdenas, F., Auderheide, A. 2000. Chagas disease and human migration. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 95. Pp 553-555.
- Guhl, F. 2005. Control de la enfermedad de Chagas. Memorias del primer taller internacional sobre el control de la enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia. Pp 435.
- Guhl, F. 2009. Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. Revista Española de Salud Pública. 20(18): 228-234.
- Guhl, F. 2013. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Española de Salud Pública*. 1:1-8.
- Guzmán, D. 2015. Caracterización de la distribución poblacional y dispersión local en diferentes micro hábitats de *Triatoma dimidiata* y su efecto en la prevalencia y distribución de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Tesis de doctorado. Centro de investigaciones biomedicas. Universidad Veracruzana. Xalapa Veracruz. México.
- Herrera, L. 2016. Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas: Desde el triángulo equilátero al escaleno. *Tribuna del investigador* 17(2):75-87.
- Hotez, P. J., Dumonteil, E., Heffrnan, M. J., Y Bottazzi, M. E. 2013. Innovation for the “bottom 100 million”: eliminating neglected tropical diseases in the Americas. En: Nigel. C., Adam, F., Pollard, P. 2018. Hot Topics In Infection and immunity in Children IX. Springer. Pp 1-12.
- Ibáñez-Cervantes, G., Martínez- Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduna, E., Alonso, A., Perea, C., León-Avila, G. 2013. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitology international*. 62(1): 36-43.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2015. Conociendo a Chiapas.

[http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/702825212964.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/702825212964.pdf). Consultado el 16 de Marzo de 2019.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2015. Conociendo a Oaxaca. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/OAXACA.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/OAXACA.pdf). Consultado el 16 de Marzo de 2019.

Leonard, J. 1991. Carlos chagas, Pionero de la salud en el interior del brasil. *Bol of Sanit.* 110(3): 185-198.

Machado, C. y Ayala, F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98(13): 7396–7401.

Marcili, A., Valente, V., Valente, S., Junqueira, A., da Silva, F., das Neves Pinto, A., Miles, M. 2009. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* And in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology.* 39(5): 615-623.

Martines-Cuevas, T. 2018. Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el estado de Oaxaca. Tesis de doctorado. Departamento de biomedicina molecular. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto politecnico nacional. Ciudad de México. México.

Muñoz, C., Solari, A., Apt, W., 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.

Rassi, A, Jr., Rassi, A., Marcondes, R. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America.* 33: 119-134.

Roelling, D., Mason, Y., Savage, A., Fujita, W., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F., Yabsley, M. 2013. Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates

from the united states. Plos one. 8(2).

Sanmartino, M. 2009. 100 años de Chagas ( 1909-2009 ): revisión , balance y perspectiva. *Sociedad Entomologica Argentina*. 68: 243–252.

Salazar Schettino, P., De Haro, I. Cabrera, M, 2005. Tres especies de triatomos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Revista de medicina de Buenos Aires*. 65: 63- 69.

Souto, R. P., Fernandes, O. Macedo, A. M. Campbell, D. A. Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. 1996. *Molecular and biochemical parasitology*. Elsevier. Pp 141-152.

Spotorno O, A. E., Córdova, L. y Solari I, A. 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier. 8:898–900.

Toso, A., Felipe, V, U., Galanti, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Medica de Chile*. 139: 258-266.

Westenberger, S.J., Barnabé, C., Campbell, D.A., Sturn, N.R. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.

World Health Organization. 2019. Distribution of cases of *Trypanosoma cruzi* infection, based on official estimates and status of vector transmissions, 2006-2009. Obtenido en: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Consultado el 12 de abril del 2019.

Zingales, B., Andrade, S., Campbell, D., Fernandes, O., Guhl, F. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to Tc. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. Brasil. Pp. 1051–1054.

Zingales, B. 2011. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?. *Revista de Biologia*. 6(b):44–48

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A., Llewellyn, M., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S., Sturm, N.R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications