



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización de cepas mexicanas de *Trypanosoma
cruzi* aisladas de reservorios didélfidos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CRISTINA BASTIDA JAIME

TUTORA

DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Berta Josefina Espinoza Gutiérrez por la asesoría para realizar esta tesis de licenciatura.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su apoyo técnico en el cultivo de células VERO, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y en la obtención de sueros de cobayo empleados en este trabajo.

Al Dr. Alejandro Cruz Reyes por la donación de las cepas con las que se trabajó en esta tesis.

A la Técnico Académico Patricia de la Torre y al Dr. Juan Pablo Laclette por la secuenciación de genes de las cepas utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia de la unidad de microscopía electrónica del IIB, por su asesoría en el uso del microscopio invertido.

Al Dr. Daniel Sokani por su apoyo en el análisis y elaboración de los árboles filogenéticos realizados en este trabajo.

Al Dr. Alberto Pizaña, Jefe del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, por la generosa donación de los cobayos empleados para la obtención de suero.

Al Biólogo Luis De Jesús por su apoyo en la técnica de lisis por complemento.

A la Bióloga Paulina Díaz Garrido por su apoyo para realizar geles para DNA y proteínas además de Western Blot.

A la Bióloga Karla Rodríguez Hernández por su apoyo en la infección de células VERO.

Al Biólogo Esteban Santa Cruz por su apoyo con el análisis de secuencias.

A la Licenciada en Diseño Gráfico Dafne Bastida Jaime por su apoyo con materiales gráficos.

Al Sr. Osvaldo Martínez por su apoyo como laboratorista y en la limpieza de material.

A la Sra. Martha Ramírez por su apoyo como auxiliar de laboratorio.

A DGAPA-PAPIIT, UNAM por su apoyo en el proyecto IN208417

DEDICATORIA

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	<u>1</u>
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	<u>2</u>
1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas	2
1.1.1 Mecanismos de Transmisión	2
1.1.1.1 Reservorios	4
1.1.2 Fases de la enfermedad	5
1.1.3 Epidemiología	7
1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas: generalidades de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.2.1 Taxonomía	8
1.2.2 Estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i>	9
1.2.3 Ciclo de vida	11
1.2.4 Metaciclogénesis	12
<u>2. ANTECEDENTES</u>	<u>13</u>
2.1 Genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.1.1 Distribución de DTU's	18
2.1.1.1 Situación en México	20
2.2 Variabilidad biológica	25
<u>3. JUSTIFICACIÓN</u>	<u>27</u>
<u>4. OBJETIVOS</u>	<u>27</u>
<u>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	<u>28</u>
<u>6. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>29</u>
6.1 Selección de cepas	29
6.2 Caracterización genética	29
6.2.1 Extracción de DNA de <i>T. cruzi</i>	29
6.2.2 Cuantificación de DNA genómico	30
6.2.3 Amplificación del gen de mini-exón por PCR punto final	30
6.2.4 Amplificación de subunidad 18S del rDNA por PCR punto final	31
6.2.5 Amplificación de un fragmento del citocromo B de <i>T. cruzi</i>	31
6.2.6 Amplificación de un fragmento de la SSU del rDNA	32
6.2.7 Secuenciación del fragmento de <i>CytB</i> y de la SSU del rDNA	32

6.2.8	Análisis de las secuencias de <i>CytB</i> y <i>SSU</i> del rDNA	33
6.3	Caracterización biológica	33
6.3.1	Cinética de crecimiento	33
6.3.2	Inducción de metaciclologénesis	34
6.3.3	Lisis por complemento	34
6.3.4	Infección <i>in vitro</i> en células Vero	35
6.4	Caracterización antigénica	36
6.4.1	Obtención de extractos proteico por medio de sonicación	36
6.4.2	Cuantificación proteínas	37
6.4.3	Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida	37
6.4.4	Western Blot	37
6.5	Análisis estadísticos	38
7.	RESULTADOS	39
7.1	Caracterización genética	39
7.2	Caracterización biológica	46
7.2.1	Evaluación de la cinética de crecimiento en medio LIT	46
7.2.2	Porcentaje de metaciclologénesis	47
7.2.3	Cuantificación de infección <i>in vitro</i> en células Vero	49
7.3	Perfil proteico y caracterización antigénica	52
8.	DISCUSIÓN	58
9.	CONCLUSIÓN	64
10.	PERSPECTIVAS	64
11.	REFERENCIAS	65
12.	ANEXOS	71

RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), presenta una amplia distribución en el continente Americano, abarcando desde el sur hasta el centro de Estados Unidos; además, la infección se ha extendido a países de Asia, Europa y Oceanía. En México es endémica en estados como Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Morelos, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Veracruz.

Este parásito es diverso genéticamente y se le ha agrupado en seis unidades discretas de tipificación (DTU's). Dentro de estos grupos el TcI se ha relacionado fuertemente con las infecciones humanas en México, aunque diversos estudios reconocen la presencia de los otros cinco DTU's en el país.

En el presente estudio se evaluaron cinco cepas mexicanas de *T. cruzi* aisladas de reservorios didélfidos del estado de Veracruz. Usando marcadores diferentes como mini-exón, 18S del rDNA, además de la secuenciación de las SSU del rDNA y *citocromo B*, se obtuvieron árboles filogenéticos que muestran el agrupamiento de las cepas Ver 4 y Ver 5 en el DTU TcI, mientras que las cepas Ver 1, Ver 3 y Ver 6 se agruparon con TcVI.

La comparación del comportamiento biológico también se realizó evaluando el crecimiento y la metacicloogénesis de estas cepas, encontrando diferencias significativas de transformación entre las cepas del DTU TcVI contra TcI. Con respecto al parámetro de infección *in vitro* no se observaron diferencias por DTU. Al realizar un análisis de las proteínas totales de dichas cepas se observó que existen proteínas compartidas por cepas, y hay otras proteínas que solo están presentes en determinados DTU, lo mismo se observó con la evaluación de proteínas antigénicas.

Este análisis es de los primeros en estudiar las cepas mexicanas de *T. cruzi* que pertenecen al linaje TcVI en ámbitos genéticos y biológicos. Es importante ya que nos permite saber que existe una diversidad de este parásito en México ayudándonos a estudiar las fuentes de propagación ampliando la información de las cepas no-TcI en el país.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis causada por el protozooario *T. cruzi*, la cual se caracteriza por su cronicidad y su daño sistémico. Es considerada como una de las 13 enfermedades tropicales olvidadas que afecta tanto a niños, adultos en edad productiva y ancianos (Rassi *et al.*, 2010).

Esta parasitosis es endémica de América Latina por la presencia de sus principales transmisores, insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, conocidos en México como “chinchas besuconas”. Este triatómino puede desplazarse fácilmente entre los ambientes domésticos, peridomésticos y selváticos, lo que juega un papel importante en la distribución de las poblaciones del parásito a lo largo de las diferentes áreas geográficas (WHO, 2007).

Desde el descubrimiento de esta enfermedad en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, se han tratado de esclarecer los factores biológicos, genéticos y geográficos, que hacen de esta parasitosis un grave problema de salud pública en América Latina (Rassi *et al.*, 2010, 2012).

Los principales daños causados por dicho parásito se observan principalmente en órganos y tejidos, como el corazón y el sistema digestivo quienes son afectados de manera grave e irreversible (WHO, 2002). Es por ello que se busca aplicar estrategias que eviten la diseminación de la enfermedad por medio de la implementación de algunas prácticas como el control vectorial y el tamizaje de sangre y órganos para donación, ya que éstas son otras formas de transmisión del parásito (Rassi *et al.*, 2010). En países no endémicos, los movimientos migratorios de personas infectadas que son donadores activos, ha propiciado la llegada de la infección a zonas como el norte de Estados Unidos, Canadá y Europa donde antes no era reportada (Schmunis y Yadon, 2010; WHO, 2007).

1.1.1 Mecanismos de transmisión

Existen diferentes vías de entrada que hacen posible la infección de *T. cruzi* hacia el humano y varios órdenes de mamíferos tanto domésticos como silvestres, encontrando perros, gatos, ratones, murciélagos, armadillos y marsupiales, quienes fungen como reservorios ecológicos o epidemiológicos (Dumonteil, 1999; Filigheddu *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010).

La principal fuente de transmisión en países endémicos es a través de las heces del triatómino infectado, con una prevalencia del 80 al 90% de los casos. A lo largo de América Latina se conocen cerca de 130 especies de este insecto, donde en los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* se encuentran las especies más importantes dentro de ciclos selváticos, peridomésticos y domésticos (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; WHO, 2002; Rassi *et al.*, 2010). Estas chinches se encuentran distribuidas distintamente en América, desde México hasta Argentina y Chile. Algunas especies de vectores importantes en los países del Cono Sur son: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*, mientras que *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* se localizan en zonas de centro y sur América. Las especies con mayor importancia reportadas en México son *T. dimidiata*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma longipennis* y *Triatoma barberi* (Fig. 1), con una amplia distribución en el centro y sur del país (Martínez *et al.*, 2006). Dentro de las características o atributos que permiten a los triatóminos ser buenos vectores resaltan el comportamiento biológico, la adaptabilidad intradomiciliaria, la antropofilia, la susceptibilidad de infección y la capacidad que tienen para transmitirla (WHO, 2007).

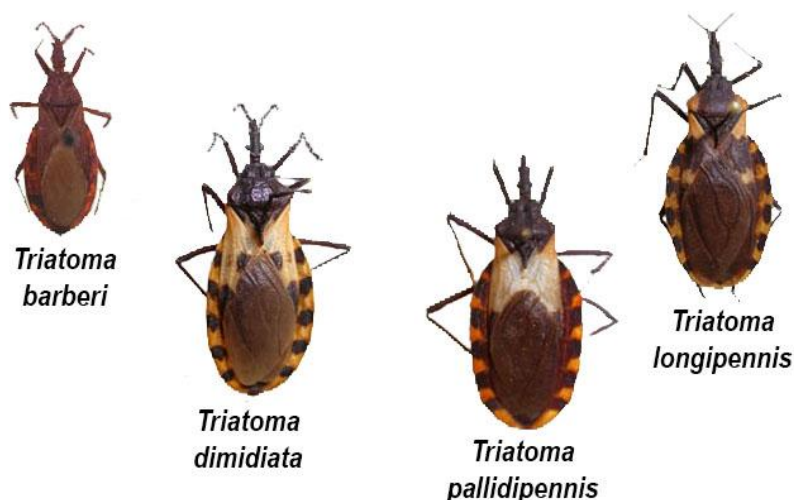


Figura 1. Principales especies transmisoras de *T. cruzi* en México, pertenecientes al género *Triatoma*. Su distribución abarca el centro y suroeste del país, presentando hábitos domésticos y peridomésticos. Imagen tomada y modificada de Salazar-Schettino *et al.* 2006.

Existen otras formas de adquirir al parásito que son independientes del triatómino, las cuales se conocen como transmisión no vectorial. Dentro de éstas se encuentra la transfusión de sangre, la cual representa un grave problema de infección en países no endémicos. Se ha calculado que el riesgo de contraer la enfermedad de Chagas por medio de una unidad de 500 mL de sangre infectada es del 10-20% (Rassi *et al.*, 2010, 2012). Igualmente se ha documentado tanto en América Latina como en EUA, Canadá y Europa, la adquisición del parásito por medio de donaciones de órganos y médula ósea provenientes de personas con enfermedad crónica de Chagas.

La transmisión congénita o vertical también se considera un riesgo latente, se presenta en al menos el 5% de las mujeres embarazadas infectadas, en países endémicos como Bolivia, Chile y Paraguay; en México estudios recientes estimaron que este tipo de transmisión se presenta en un 6.3% de mujeres embarazadas (Buekens *et al.*, 2017). Ésta se ha tomado como la principal forma de transmisión en zonas urbanas y regiones no endémicas como Europa. En América Latina se ha calculado que hay 14,385 casos de transmisión congénita por año (Ministerio de Salud, Chile, 2010).

Por último, la infección por vía oral ha cobrado importancia epidemiológica debido a que en países endémicos como Brasil, Colombia, Venezuela, Argentina y Ecuador, se han reportado varios casos de infección aguda a causa de la ingesta de jugos de frutas tropicales que fueron contaminados por el parásito. Esta contaminación puede deberse a la molienda de chinches infectadas, a través de las heces de los insectos o por medio de la excreción de parásitos por las glándulas odoríferas de reservorios marsupiales o por la ingesta de carne cruda de animales infectados (Rodrigues, 2015; Toso *et al.*, 2011). Muchos de estos casos se han reportado con desenlaces fatales debido a la gravedad de la infección.

1.1.1.1 Reservorios

Un elemento fundamental que permite el mantenimiento de *T. cruzi* en ciclos selváticos y domésticos son los reservorios mamíferos que funcionan como organismos de reserva de los patógenos. Se consideran reservorios de *T. cruzi* al menos ocho órdenes de mamíferos y más de 180 especies, estos animales representan la movilidad y capacidad de dispersión del parásito (Messenger *et al.*, 2015). Entre los organismos que se han reportado como reservorios naturales de *T. cruzi* están los murciélagos, armadillos, roedores, marsupiales didélfidos, etc; animales de ganado como cerdos, borregos y domésticos como perros y gatos (Izeta-Alberdi *et al.*, 2016).

Un punto fundamental que hace tan importantes a los reservorios es que ellos son la conexión entre los ambientes selváticos, peridomésticos y domésticos, siendo muy importante este último ya que los animales de compañía fungen como centinelas aumentando el riesgo de infección para los humanos (WHO, 2002).

La especie con mayor importancia epidemiológica son los marsupiales (*Didelphis spp.*) ya que unen el ciclo selvático y doméstico del parásito. Los didélfidos son considerados el reservorio por excelencia de *T. cruzi* ya que se ha encontrado con grandes tasas de infección, viven en constante contacto con los triatomíneos, además, son transmisores

potenciales del parásito pudiendo eliminarlo tanto en la orina como a través de sus glándulas anales, lo que favorece la infección oral (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2006; WHO, 2002). La distribución de estos organismos es muy amplia, desde Sudamérica hasta Estados Unidos, en México se presentan ocho especies de *Didelphis spp.*, de las cuales siete están presentes en el estado de Veracruz (CONABIO, 2006).

1.1.2 Fases de la enfermedad

La infección con *T. cruzi* presenta signos y síntomas muy variados, uno de los primeros aparece como una inflamación localizada de la piel en la zona donde se realizó la inoculación por vía vectorial, conocida como Chagoma (menos del 50% de los casos) o bien, si la entrada del parásito fue por medio de la mucosa ocular, se observará una inflamación en el párpado, conocida como signo de Romaña (WHO, 2017). Posterior a la adquisición del parásito, las personas infectadas pueden atravesar por dos etapas principales en la enfermedad: la fase aguda y la fase crónica.

La *fase aguda* se presenta rápidamente, de una a dos semanas después de la inoculación vía vectorial, o de tres a cinco semanas después de una transfusión sanguínea. La duración puede ser de cuatro a ocho semanas presentando síntomas inespecíficos como fiebre prolongada, dolor de cabeza, vómito, diarrea, somnolencia, un edema localizado y generalizado, etc (Dumonteil, 1999; Rassi *et al.*, 2012; WHO, 2002). Esta etapa se caracteriza por presentar parasitemia alta y una respuesta inflamatoria general donde en la mayoría de los casos no existe ninguna complicación (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

La mayoría de los diagnósticos oportunos se realizan por medio de estudios epidemiológicos dirigidos a las áreas endémicas donde se observa la presencia de los vectores. Las pruebas diagnósticas que se llevan a cabo para confirmar la infección en la fase aguda se basan en la observación directa al microscopio del parásito en una muestra de sangre, también se llega a realizar xenodiagnóstico (se usa al insecto vector como medio biológico de cultivo para la detección del parásito) y hemocultivo (cultivo microbiológico de la sangre) (WHO, 2007).

Los pacientes en fase aguda pueden ser tratados por fármacos nitroheterocíclicos, Benznidazol y Nifurtimox, los cuales representan una cura durante esta fase en el 80% de los casos y previene manifestaciones crónicas (Rassi *et al.*, 2010; WHO, 2007). Cabe resaltar que dichos fármacos son altamente mutagénicos y tóxicos para las células, por lo que la ingesta de ellos desencadena una serie de efectos secundarios que en ocasiones llevan al abandono del tratamiento por los pacientes.

La respuesta inmune desencadenada en el humano permite que la concentración de parásitos se reduzca, cuando ésta alcanza niveles muy bajos, la enfermedad se encuentra subpatente lo que señala el final de la fase aguda (Rassi *et al.*, 2010), sucedida por la *fase indeterminada*, la cual se da en el 60-70% de los casos, teniendo una duración de cinco a 40 años. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos y síntomas con presencia de un alto título de anticuerpo anti-*T. cruzi* en sangre. El diagnóstico durante esta fase se puede realizar con pruebas serológicas como ELISA, inmunofluorescencia indirecta, Western Blot, hemoaglutinación, entre otros (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

La *fase crónica* sintomática comienza de ocho a 12 semanas después de la infección inicial y se presenta en el 30 al 40% de los infectados, las manifestaciones clínicas típicas de esta fase son el daño al corazón, sistema digestivo o ambas. El establecimiento de la enfermedad crónica se relaciona con una inmunodepresión, lo que permite el restablecimiento de los parásitos circulantes en el torrente sanguíneo y la posibilidad de invasión y destrucción de diferentes células y tejidos como músculo, teniendo como blancos principales el corazón, el aparato digestivo y el tejido nervioso (Rassi *et al.*, 2010, 2012). El curso de la enfermedad se determina por la concentración de parásitos, la inflamación y el daño ejercido a los tejidos. El diagnóstico durante esta fase se realiza igual que en la fase indeterminada, además estudios como electrocardiograma y radiografía de tórax, donde se evalúan afectaciones a nivel de corazón y sistema digestivo (WHO, 2007, 2017).

La cardiopatía crónica Chagásica (CCC) es la manifestación más grave y más frecuente en los pacientes, presentándose en el 20-30% de los infectados. Esta anomalía aparece como un deterioro progresivo de la función contráctil y la dilatación de las cámaras del corazón. Los primeros signos de daño cardiaco se presentan como anomalías en el sistema de conducción, arritmias, fibrosis y necrosis (Rassi *et al.*, 2010, 2012). La CCC propiamente, se presenta en su mayoría, con el bloqueo de la rama derecha del haz de His, aunque también se puede dar un aneurisma e insuficiencia cardiaca, entre otros. Esta etapa de la enfermedad es altamente incapacitante, teniendo como desenlace la muerte súbita en el 75% de los casos (Rassi *et al.*, 2012).

El daño en el tracto digestivo también es observado comúnmente y se presenta por medio de megasíndromes que se asocian con disfagia y pérdida de peso, dentro de los síndromes más comunes están el megacolon y megaesófago con un 10-15% de incidencia en la enfermedad crónica (Rassi *et al.*, 2010). Los principales signos de daño digestivo son las alteraciones motoras, secretoras y de absorción tanto del esófago como del tracto gastrointestinal, las lesiones en el sistema entérico son comunes, causando daño a menudo en el plexus mioentérico (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

1.1.3 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es endémica de 21 países de América Latina distribuyéndose por sur, centro y algunas partes de norte América como México y el sur de Estados Unidos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se estima que existen de seis a siete millones de infectados crónicos con 25 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y de 10,000 a 14,000 defunciones por año (OPS, 2012; WHO, 2017). La mayor seroprevalencia se ha registrado en Bolivia (51%), Argentina (17.6%) y Brasil (14.6%), mientras que en México se estima una prevalencia del 1% con una incidencia de 0.81 por cada 100,000 habitantes para el 2016 (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; Dirección general de epidemiología, 2016; Rassi *et al.*, 2012).

Considerada en sus inicios como una enfermedad restringida a zonas rurales y a sectores pobres de la población, actualmente la Tripanosomiasis Americana se encuentra presente en grandes ciudades debido a los movimientos migratorios de personas infecta hacia las zonas urbanas y países no endémicos, ha cambiado las características epidemiológicas de la enfermedad (WHO, 2007). La llegada a países como Australia, Japón, Francia, Suiza, Suecia, Inglaterra, España, Canadá y el norte de Estados Unidos ha prendido los focos rojos sobre esta parasitosis a nivel mundial (Fig. 2).

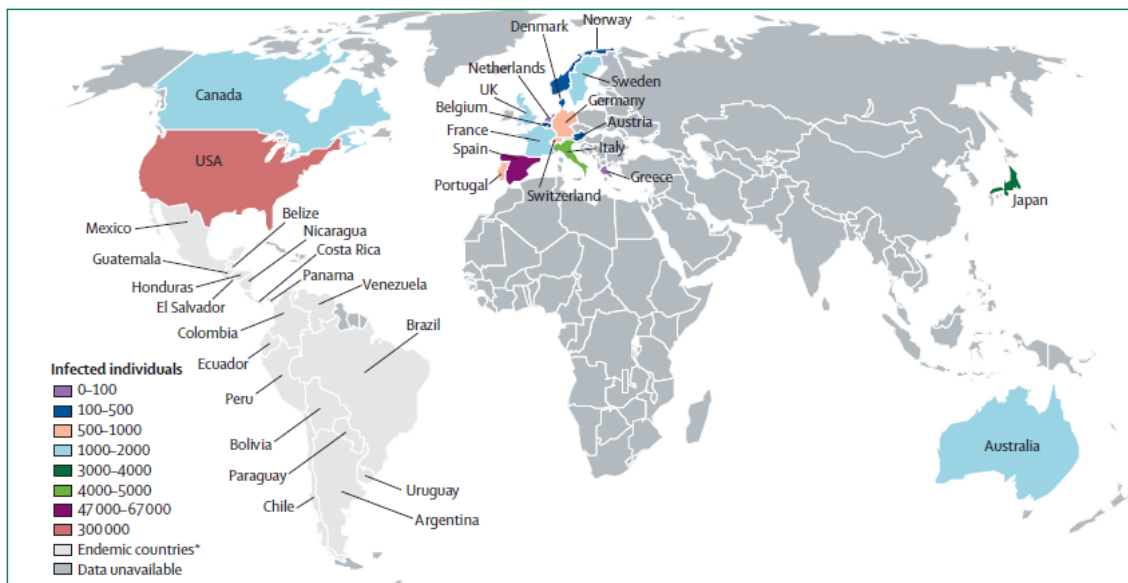


Figura 2. Países con presencia de la enfermedad de Chagas. En color se resaltan los países no endémicos, a los cuales se ha diseminado la enfermedad debido a la migración de personas infectadas, las cuales con fuente de transmisión por medio de las donaciones de sangre y órganos. En blanco se resaltan los países endémicos con presencia del insecto transmisor. Imagen tomada de Rassi *et al.*, 2012.

Dentro de los países no endémicos, Estados Unidos encabeza la lista con 300,167 personas infectadas, encontrando sólo 11 casos autóctonos a pesar de ser una zona de riesgo con presencia del vector y reservorios silvestres infectados, mientras que España es el primer país del continente Europeo con más casos de personas infectadas, estimando de 47,738 a 67,423 (Rassi *et al.*, 2010,2012).

Debido a la presencia de la enfermedad a en varios continentes, se han puesto en marcha varias iniciativas para detener su propagación. Entre ellas el control vectorial que ha permitido que muchos países endémicos eliminen a los triatominos domiciliados por medio de programas de fumigación; el tamizaje al 100% de donantes de sangre, el cual ocurre en la mayoría de los países endémicos y que se comenzó a implementar en México en el 2013; el tratamiento a mujeres infectadas en edad fértil lo cual puede evitar la transmisión congénita, reduciendo nuevos casos de infección (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; OPS, 2012; Rassi *et al.*, 2010).

El escenario en México es problemático, debido a que la falta de atención a esta parasitosis ha evitado que la incidencia decrezca en los últimos años. Es importante prestar atención a los factores que permiten que esta enfermedad esté presente, para disminuir la magnitud de la enfermedad y poder prevenir su diseminación (WHO, 2007).

1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas: generalidades de *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Taxonomía

Trypanosoma cruzi el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozooario hemoflagelado cuya posición taxonómica lo agrupa dentro de la categoría Kinetoplastea, caracterizándose por presentar un cinetoplasto, que es una red de DNA extracelular en forma de disco cóncavo que representa del 20-25% del DNA total del parásito, formado por moléculas de maxicírculos y miles de copias de minicírculos (20,000 a 30,000) localizado en su única mitocondria, la cual se extiende por toda la célula (Fig. 3) (De Souza, 2002; Rassi *et al.*, 2012).

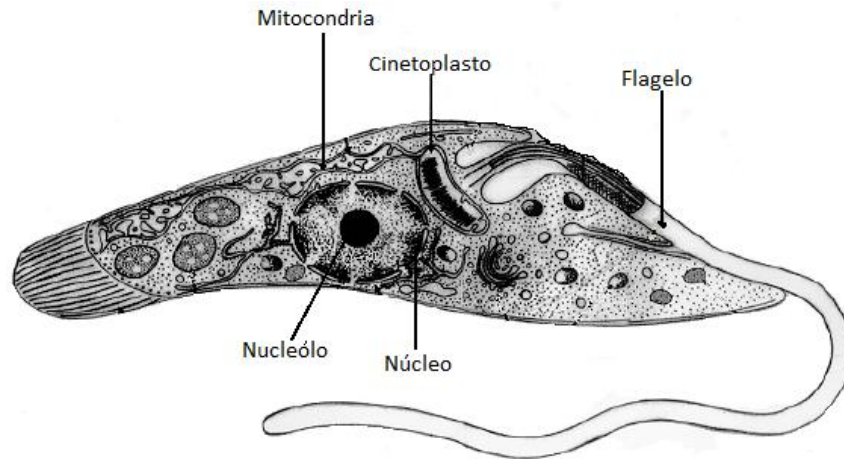


Figura 3. *Trypanosoma cruzi* en su forma de epimastigote. Se observa la presencia de un flagelo el cual se encuentra posterior al cinetoplasto, que se ubica en la mitocondria y un núcleo anterior al cinetoplasto con presencia de nucleólo. Imagen modificada de De Souza, 1999.

La clasificación taxonómica asignada desde 1980 por Levine *et al.*, fue revisada y actualizada por Adl para los protozoarios incluyendo a *T. cruzi*, asignándolo dentro de un Super-grupo y seis categorías presentadas a continuación:

Super-grupo Excavata

Primera categoría Discoba

Segunda categoría Discicristata

Tercera categoría Euglenozoa

Cuarta categoría Kinetoplastea

Quinta categoría Metakinetoplastina

Sexta categoría Trypanosomatida

Género *Trypanosoma*

Especie *Trypanosoma cruzi*

(Adl *et al.*, 2012)

1.2.2 Estadios de desarrollo de *T. cruzi*

Durante su desarrollo, *T. cruzi* atraviesa por varios cambios morfológicos que le facilitan la supervivencia en el ambiente donde se desarrolla. Este parásito presenta un ciclo de vida complejo dentro de un hospedero vertebrado y otro invertebrado, con estadios replicativos e infectivos (Contreras *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2010). Actualmente se reconocen principalmente tres formas clásicas, aunque es importante mencionar que se han descrito también varias formas intermedias entre éstas, ya sea en los hospederos o en los medios de cultivo, los cuales presentan diversas morfologías, así como propiedades biológicas, expresión génica, metabólicas y antigénicas diferenciadas.

Las formas principales se describen a continuación:

- Epimastigote, forma replicativa por medio de fisión binaria, se encuentra en el intestino medio del insecto y se puede reproducir en medios de cultivo axénicos fácilmente. No invade células activamente y no resiste la digestión por macrófagos ni la acción del complemento. Su forma es alargada como un huso, presenta flagelo y el cinetoplasto se ubica anterior al núcleo (Fig. 4a).
- Tripomastigote metacíclico (TM), forma infectiva presente en el recto del vector, en medio de cultivo se ha observado durante la fase estacionaria, procedente de epimastigotes. Este estadio no tiene capacidad multiplicativa, invade activa o pasivamente y coloniza células, resiste la digestión por macrófagos y la acción del complemento (Fig.4b) (Rassi *et al.*, 2010).
- Tripomastigote sanguíneo, no replicativo, procede de amastigotes, sin capacidad multiplicativa, invade activamente la célula y la coloniza, resiste la acción del complemento y evade la digestión de macrófagos. Puede continuar el ciclo en el hospedero invertebrado. Se caracterizan por presentar una membrana ondulante y el cinetoplasto posterior al núcleo (Fig.4b) (De Souza *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012).
- Amastigote, forma replicativa intracelular en el hospedero mamífero, presenta una forma ovoide sin flagelo (Fig. 4c). Tiende a formar agregados intracelulares y procede de TM o tripomastigotes sanguíneos, resiste la acción del complemento, es fagocitado por cualquier célula y evade la digestión proteolítica de estas células (De Souza *et al.*, 2010).

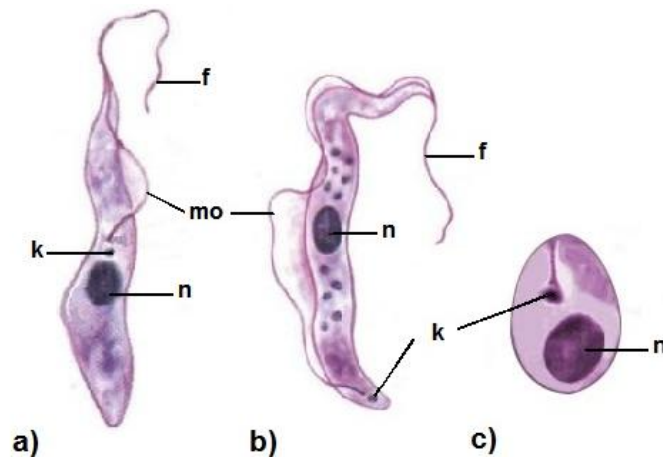


Figura 4. Formas principales de *Trypanosoma cruzi*, dentro de su ciclo de vida. a) Epimastigote, forma replicativa que se encuentra en el intestino medio del vector; b) Tripomastigote, forma infectiva que se encuentra en el recto del vector (metacíclico) y en la sangre del mamífero infectado (sanguíneo); c) Amastigotes, forma replicativa intracelular en el mamífero infectado. n (núcleo), k (cinetoplasto), f (flajelo), mo (membrana ondulante). Imagen modificada de internet.

1.2.3 Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi presenta un complejo ciclo de vida (Fig. 5), el cual comienza cuando el vector se alimenta de un mamífero infectado, donde los tripomastigotes sanguíneos circulan en sangre y son ingeridos, viajan por el intestino del insecto donde muchos son lisados (De Souza *et al.*, 2010). Los sobrevivientes se transforman en epimastigotes, quienes se replican y migran al intestino uniéndose a la membrana peri-microvellosa, la migración continua hacia la porción final del intestino, donde los epimastigotes se liberan de la membrana y se transforman en TM (etapa conocida como metacicloogénesis), los cuales son liberados en las heces fecales cuando el insecto se vuelve a alimentar (Rassi *et al.*, 2010).

La infección natural es estercorearia, se produce con el contacto con las heces infectadas del triatómino a través de lesiones en la piel, el tejido conectivo o las mucosas. Una vez dentro del hospedero, los TM comienzan a invadir células nucleadas en el sitio de la inoculación como fibroblastos, células epiteliales y macrófagos. El estadio amastigote comienza con la formación de una vacuola parasitófora donde se diferencian de los TM (Contreras *et al.*, 2006; Dumonteil, 1999; Rassi *et al.*, 2012). Los amastigotes se replican al interior de la célula transformándose a tripomastigotes sanguíneos, los cuales por la acción mecánica de su flagelo lisan la célula y son liberados al torrente sanguíneo pudiendo invadir células adyacentes o ser nuevamente ingeridos por el vector.

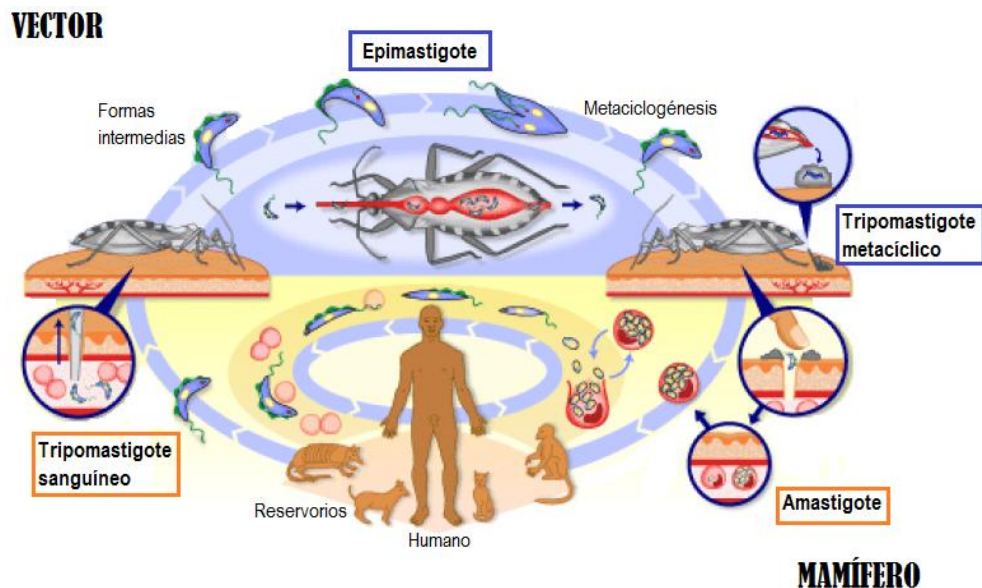


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, el cual involucra un hospedero mamífero y un vector Triatómino. En la imagen se muestran las principales morfologías por las que atraviesa el parásito a lo largo de los diferentes microambientes donde se encuentra. Igualmente se observan reservorios mamíferos antes mencionados y el humano que funge como hospedero accidental. Imagen modificada de WHO, 2007.

1.2.4 Metaciclologénesis

La metaciclologénesis es un proceso de diferenciación que garantiza el mantenimiento del parásito en la naturaleza, de forma natural se lleva a cabo en el tracto digestivo del insecto vector, en la porción del recto, donde los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Uno de los resultados de este proceso es la obtención de formas infectivas que puedan sobrevivir en el hospedero vertebrado, donde estará bajo la presión del sistema inmune. Se han evaluado las características microambientales que promueven la diferenciación de este parásito, encontrando que responde a presiones de competencia y estrés, destacándose la acumulación de metabolitos secretados por los epimastigotes, cambios en el pH, cambios en la concentración de glucosa, cambio en el nivel osmótico, etc (Contreras *et al.*, 2006; Muskus y Marin, 2002).

Además de la evidente transformación morfológica que sufre *T. cruzi*, este proceso se acompaña de una expresión diferencial de moléculas y proteínas que le permiten evadir la respuesta inmune de su hospedero, principalmente evitando la lisis del parásito a través de las vías del complemento. Algunas de las moléculas presentes en la superficie de *T. cruzi* que son indispensables para evadir la respuesta inmune del vertebrado son: proteína reguladora del complemento (CRP), factor de aceleramiento del decaimiento de *T. cruzi* (T-DAF), calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), glicoproteínas como la gp82, entre otras, cuya principal función es el evitar la formación del émbolo lítico sobre la superficie del parásito, inhibiendo la formación de diferentes convertasas, permitiendo así la invasión celular (Cardoso *et al.*, 2016; Tapia *et al.*, 2012).

A lo largo del tiempo se han probado varios métodos de cultivo *in vitro* para obtener formas infectivas con mayor facilidad, partiendo de la idea de simular los procesos de diferenciación natural, en medios de cultivo. Un medio muy usado para el crecimiento de la forma replicativa es el medio LIT (Liver Infusion Tryptose), el cual al estar complementado con hemina permite la replicación del parásito, además de promover la transformación espontánea hacia su forma infectiva, tripomastigote metacíclico, que aparece durante la fase estacionaria del cultivo envejecido de 9 a 11 días (López-Olmos *et al.*, 1998; Seco Hidalgo *et al.*, 2015). Otro medio utilizado para favorecer la metaciclologénesis es el medio TAU, el cual químicamente simula la orina del triatomino provocando estrés nutricional el cual actúa como factor desencadenante de la diferenciación (Contreras *et al.*, 2006). El medio GRACE que está compuesto por sales, aminoácidos, vitaminas, azúcares y ácidos, también es muy utilizado para este proceso de diferenciación debido a que el estrés alimenticio y osmótico combinado con una alta densidad celular, favorecen mayores porcentajes de metaciclologénesis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Genética de *Trypanosoma cruzi*

Desde tiempos muy tempranos la biología única de *T. cruzi* llamó la atención en ámbitos genéticos debido a su heterogeneidad, desde entonces gran variedad de ensayos se han utilizado para clasificarlo en diversos subgrupos que fueron nombrados de diferentes maneras, entre ellos: zimodemas por la variabilidad isoenzimática encontrada en los aislados (Sturm y Campbell, 2010; WHO, 2007); biodemas asociando las diferencias en la patogenicidad y virulencia en un modelo *in vivo*; esquizodemas de acuerdo a los perfiles del kDNA; clonets refiriéndose a cepas que son distinguibles con un conjunto de marcadores genéticos dados, etc (Rojas, 2009; Zingales *et al.*, 2009, 2012).

A pesar de ser un organismo con una reproducción clonal marcada, su estructura poblacional responde a un modelo epidémico, donde se presenta recombinación entre las poblaciones (Smith *et al.*, 1993), contribuyendo a la heterogeneidad genética, que a su vez, desencadena modificaciones en su comportamiento biológico como son crecimiento *in vitro*, porcentajes de transformación, antigenicidad, virulencia e infectividad *in vivo* (López-Olmos *et al.*, 1998; Machado y Ayala, 2001). Desde 1979 se han realizado diferentes estudios por medio de riboprinting y electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), a través de los cuales se demostró que existía una clara división del taxón en dos grandes linajes, que en 1999 fueron nombrados como *T. cruzi* I y II. Posteriormente, por medio de ensayos de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) se lograron distinguir 5 subdivisiones en el linaje *T. cruzi* II, las cuales fueron nombradas como *T. cruzi* IIa-IIe (Bosseno *et al.*, 2001; De Souza, 2002).

En el año 2009 un comité experto en *T. cruzi* llegó al acuerdo de que la nomenclatura adecuada para clasificarlo es como DTU's (Discrete Typing Units), un subagrupamiento de las cepas que comparten las mismas características genéticas, determinadas por una serie de marcadores moleculares son genéticos e inmunológicos. La nomenclatura hasta ahora es DTU: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

Diferentes marcadores nucleares como el mini-exón, la subunidad 24S α y 18S del rDNA han sido utilizados ampliamente para tipificar las diferentes cepas de este parásito, utilizando una secuencia de análisis o algoritmos de tipificación (Fig. 6). En la literatura se han publicado numerosos trabajos que siguen el esquema antes mencionado, teniendo como resultado amplificaciones diferenciales, por lo que varios autores recomiendan no sólo usar estos marcadores, sino también utilizar genes tanto nucleares como mitocondriales y secuenciarlos para realizar una reconstrucción filogenética (Brisse *et al.*, 2001; Marcet *et al.*, 2005).

Dentro de los marcadores mitocondriales que se recomiendan usar está el citocromo B (*CytB*), kDNA, citocromo oxidasa subunidad II (*COII*) y NADH deshidrogenasa subunidad I (*ND1*) los cuales permiten el agrupamiento de las cepas por grupo genético (Brisse *et al.*, 2001). Los resultados observados con todos los marcadores confirma que tanto a nivel nuclear como mitocondrial esta especie presenta grandes polimorfismos genéticos (Roelling *et al.*, 2013; Zingales *et al.*, 2012).

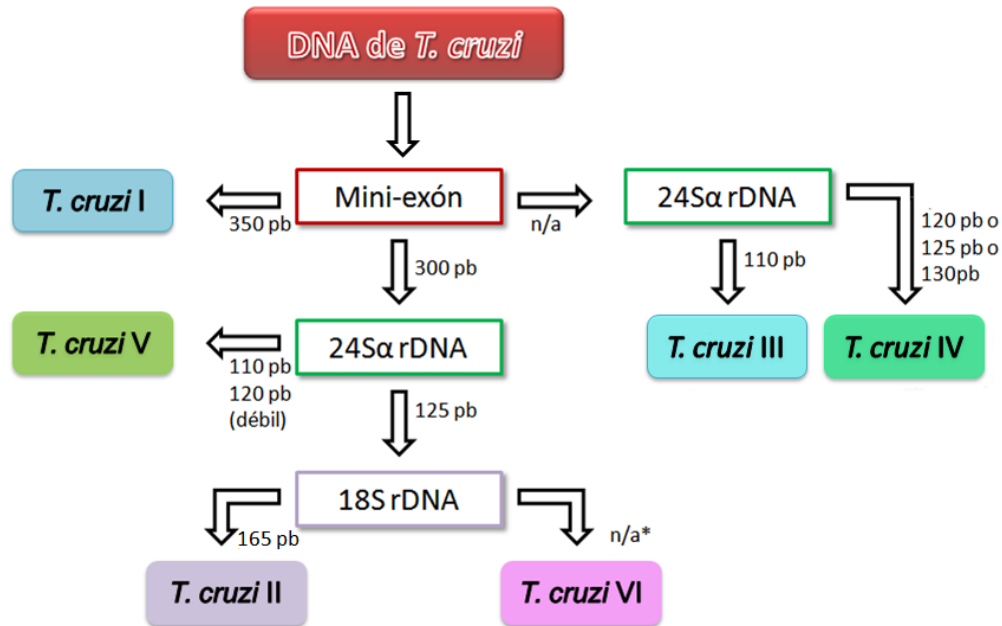


Figura 6. Algoritmo de tipificación para *T. cruzi*. Partiendo de una muestra de DNA del parásito se utilizan en el respectivo orden los marcadores nucleares mini-exón, 24Sα y 18S del rDNA. De acuerdo con el amplificado observado se deduce por discriminación el DTU correspondiente. Se pueden observar más de un amplificado con determinado marcador.*se observa amplificado en algunos casos de 165 pb. Imagen modificada de Ramírez *et al.*, 2010.

Se han postulado varias teorías que intentan esclarecer el origen de la diversidad observada en *T. cruzi* relacionando factores como hibridación, introgresión mitocondrial, reproducción sexual y modificaciones epigenéticas (Lewis *et al.*, 2011). Dentro de la historia natural del parásito se han encontrado cepas con genes constitutivos híbridos, tanto nucleares como mitocondriales, basados en estudios de diferentes secuencias que dejan al descubierto una posible reproducción sexual o parasexual no obligada, la cual se ha reportado en diferentes patógenos eucariontes, permitiéndoles adaptarse a los cambios ambientales (Lewis *et al.*, 2011).

En los modelos de hibridación en *T. cruzi* se reconoce la existencia de intercambio genético entre dos DTU's parentales, dichos eventos fueron lo suficientemente raros que permitieron la propagación de dos genotipos resultantes híbridos muy parecidos entre sí, TcV y TcVI, aunque aún queda por esclarecer si dichos DTU's resultantes provienen de dos eventos de hibridación independientes o una hibridación única seguida de diversificación clonal (Freitas *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2012). Las dos principales teorías son:

- 1) Dos hibridaciones, basándose en la secuenciación de diferentes genes de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP), histonas, IF8 (proteína de unión al calcio) y GPI (glucosa fosfato isomerasa). Westenberger y colaboradores en 2005 concluyeron que existían dos genotipos parentales, TcI y TcII derivados de un *T. cruzi* ancestral, a partir de los cuales se llevaron a cabo dos eventos de fusión en genotipos e hibridación nuclear. Durante el primer evento de hibridación entre TcI y TcII, plantean que se originaron dos nuevos DTU's, TcIII y TcIV, los cuales sufrieron recombinación homóloga y pérdida de alelos quedando con una carga homocigota en sus loci, además se observó que comparten secuencias con sus parentales. El surgimiento de los DTU's TcV y TcVI se plantea con una segunda hibridación menos antigua, ahora de los DTU's TcII y TcIII. Los genotipos resultantes son muy similares entre sí y presentan alelos heterocigóticos, debido a su reciente hibridación, pero de igual forma presentan un mosaico de genes parentales. En ambos casos se dio una posterior evolución clonal independiente fijando estos genotipos a la diversidad natural de *T. cruzi* (Fig. 7) (Westenberger *et al.*, 2005; Zingales *et al.*, 2012).

Dos Hibridaciones

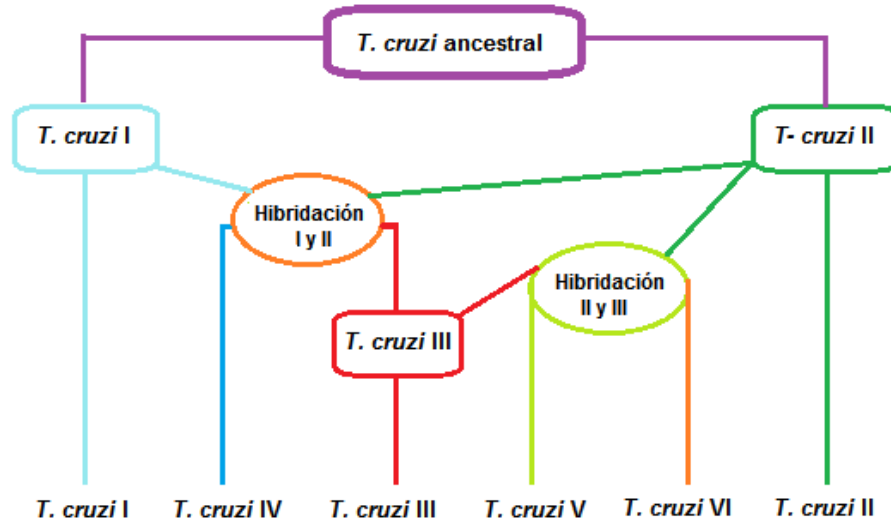


Figura 7. Modelo de dos hibridaciones. A partir de un *T. cruzi* ancestral se derivaron dos genotipos parentales, TcI y TcII los cuales sufrieron una hibridación de la cual se derivan el TcIII y TcIV, que comparten secuencias de sus parentales y presentan alelos homocigóticos. Una segunda hibridación, más reciente, se llevó a cabo entre TcII y TcIII, dando como resultado los genotipos TcV y TcVI, los cuales son muy poco diferentes entre sí y aún presentan heterocigocidad en sus alelos. Imagen realizada a partir de Westenberger *et al.*, 2005 y Zingales *et al.*, 2012.

- 2) Modelo de tres ancestros, propuesto por Freitas y colaboradores en 2006, donde utilizaron marcadores mitocondriales como COII-ND1 y *CytB*, además de los nucleares 24S α del rDNA y microsatélites, para revisar los genotipos en varias cepas donde encontraron de manera general tres haplogrupos principales, representados por los mismos haplotipos, uno TcI (Z/Z), el segundo TcII (X/X) y el último TcIII (Y/Y), los cuales fueron propuestos como genotipos ancestrales derivados de un *T. cruzi* más antiguo. En el caso de las cepas pertenecientes a los DTU's TcV y TcVI se encontraron haplotipos híbridos (X/Y) donde el TcII es considerado el receptor de los genes mientras que el TcIII es el donador. Los genotipos híbridos son resultado de dos hibridaciones independientes seguidas de una microdiferenciación de tipo clonal. En el caso de TcIV no se encontraron coincidencias con los haplotipos encontrados, por lo que se plantea que viene de una divergencia independiente (Fig. 8).

Tres ancestros

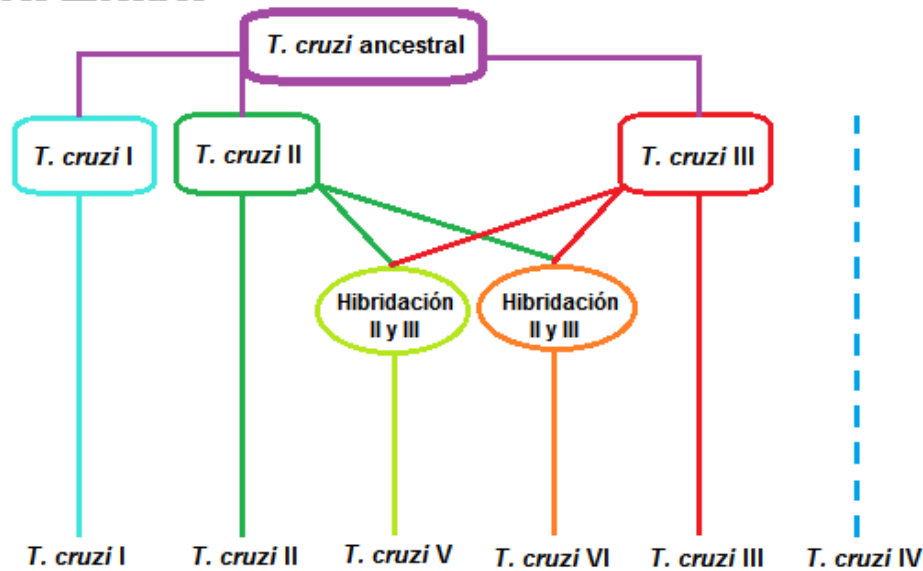


Figura 8. Modelo de tres ancestros. A partir de una cepa de *T. cruzi* ancestral se derivan los tres haplogrupos principales que, basados en marcadores nucleares, muestran gran distancia evolutiva entre ellos. Derivados de dos hibridaciones independientes entre TcII (receptor) y TcIII (donador) se fijaron en la naturaleza los genotipos híbridos TcV y TcVI. Incongruencias nucleares en los genotipos de TcIV fueron encontradas, por lo que se plantea que éste tuvo un origen divergente diferente. Imagen realizada basado en Freitas *et al.*, 2006 y Zingales *et al.*, 2012.

La diversidad de *T. cruzi* planteada por introgresión mitocondrial se basa en la heterogeneidad observada en los genomas mitocondriales de los diferentes DTU's, donde se ha visto una mezcla de los mismos entre cepas (Machado y Ayala, 2001). En los últimos años se han documentado eventos de recombinación del kDNA, retrocruzamiento o intercambio del material mitocondrial sin interferir con el material nuclear. Esto ha sido evaluado en cepas TcIII y TcIV de Sudamérica, donde los haplotipos de los maxicírculos son compartidos (Fig. 9). Igualmente en cepas TcI y TcIV provenientes de reservorios selváticos de Norte América, donde los maxicírculos son idénticos, existiendo una alta divergencia en su genoma nuclear. Las cepas híbridas presentan un fenómeno muy interesante ya que se observan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) que pueden diferenciarlas, pero también algunos SNP's que son idénticos a sus progenitores (Messenger *et al.*, 2012; Sturm y Campbell, 2010).

mamíferos silvestres teniendo como principales hospederos los marsupiales didélfidos además de roedores, primates, artiodáctilos, murciélagos, etc. (Itzeta-Alberdi *et al.*, 2016; Zingales *et al.*, 2012).

El DTU TcII se encuentra presente desde América Central hasta las regiones centro y sur de Sudamérica, abarcando Venezuela y Brasil, en éste último se considera el principal causante de la enfermedad relacionándose con manifestaciones cardiacas y megasíndromes en colon y esófago. Este DTU también ha sido aislado de insectos vectores encontrándose en ciclos de transmisión domésticos y en mamíferos silvestres como didélfidos y primates (Zingales *et al.*, 2012) (Fig. 10b).

La distribución de TcIII abarca desde el sur de México hasta el sur de Argentina cubriendo una porción de la costa del Pacífico. En Brasil se asocia con el ciclo selvático, documentándose raramente en casos humanos, se ha aislado de mamíferos como perros, carnívoros y didélfidos además de ser el DTU que se presenta mayormente en armadillos (Fig. 10c) (Rassi *et al.*, 2010; Zingales *et al.*, 2012)

Dentro de los DTU's, el TcIV presenta una distribución muy amplia, presentándose desde la región Neártica en el sur de Estados Unidos, México y hasta el sur de América en Argentina (Fig. 10d). Es considerado como la segunda causa de la enfermedad de Chagas en Venezuela, además encontrarse en todos los géneros del insecto vector y estar presente en mamíferos silvestres como armadillos y didélfidos en algunos lugares de Estados Unidos (Zingales *et al.*, 2012).

Los DTU'S TcV y TcVI presentan una distribución muy similar, abarcando las regiones centrales no ecuatoriales como México, América Central, así como Brasil y Bolivia, llegando hasta el sur de Sudamérica (Fig. 10e y f, respectivamente). Existen pocos casos de infección reportados en humanos, pero se han encontrado en insectos vectores así como en algunos mamíferos primates y carnívoros, cabe resaltar que en los marsupiales didélfidos no se ha reportado ninguno de estos DTU's de acuerdo con varios estudios, ya que no son conocidos como aislados selváticos. Revisiones de artículos descartan la presencia de estos organismos en hospederos en diversos reservorios silvestres como armadillos, primates y marsupiales didélfidos (Itzeta-Alberdi *et al.*, 2016; Messenger *et al.*, 2015)

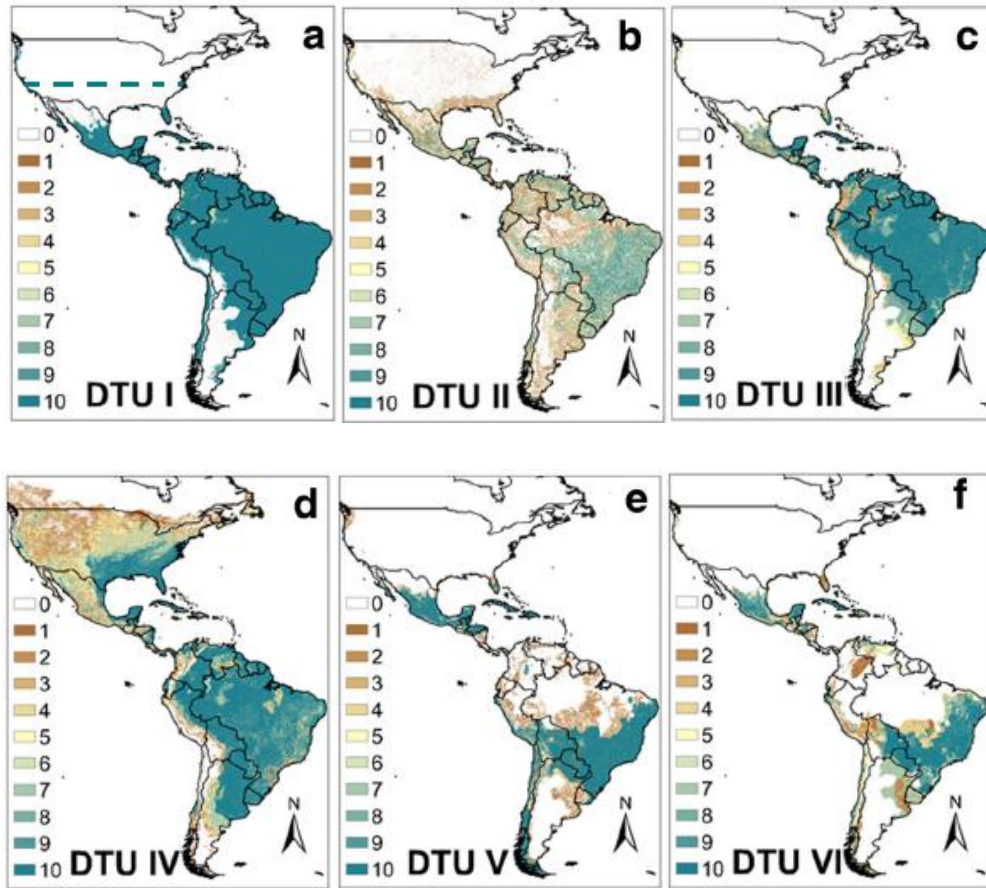


Figura 10. Distribución geográfica de los seis DTU's, realizado por Izeta-Alberdi *et al.*, mediante un modelado de nicho ecológico, los datos observados en el mapa coinciden en su mayoría con los presentados por Zingales *et al.*, 2012. a) TcI, distribución desde el norte de Estados Unidos hasta el sur de Sudamérica. b) TcII, se distribuye menormente en el norte de Estados Unidos hasta Argentina. c) TcIII, distribución desde el centro de México hasta el centro de Sudamérica. d) TcIV, distribución amplia en Latinoamérica. e) TcV, se distribuye en México y el centro de Sudamérica. f) TcVI, su distribución es de centro y sur de la República Mexicana y centro de Sudamérica. El color representa una mayor abundancia (10) a menor abundancia (1) reportada. Imagen tomada de Izeta-Alberdi *et al.*, 2016.

2.1.1.1 Situación en México

México es un país endémico para la enfermedad de Chagas, encontrándose en 18 estados dentro de los cuales destacan Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Morelos, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Veracruz (Fig. 11). En el año 2015 CENAPRECE mencionó que en México hay 1,100,000 personas infectadas encontrando la mayor incidencia en estados como Yucatán (3.87), Hidalgo (3.26) Oaxaca (2.75) y Veracruz (1.44) (CENAPRECE, 2015; Dirección general de epidemiología, 2016).

El panorama epidemiológico en México es preocupante, debido a que en él habita una gran diversidad de vectores potenciales de los cuales más del 50% se han encontrado infectados con el parásito (Dumonteil, 1999; Bosseno *et al.*, 2001). Además, también presenta una gran cantidad de reservorios domésticos y silvestres con las condiciones propicias para llevar a cabo la transmisión natural de la infección (Cruz-Reyes *et al.*, 2006). Otra gran problemática encontrada en México es el número de casos reportados de CCC en los individuos infectados; un estudio del 2002 al 2012 reveló que había cerca de 5,559 personas con este padecimiento donde el estado de Veracruz presentó el mayor número de casos con un 32.8% de ellos, volviéndolo un grave problema de salud pública (CENAPRECE, 2016).

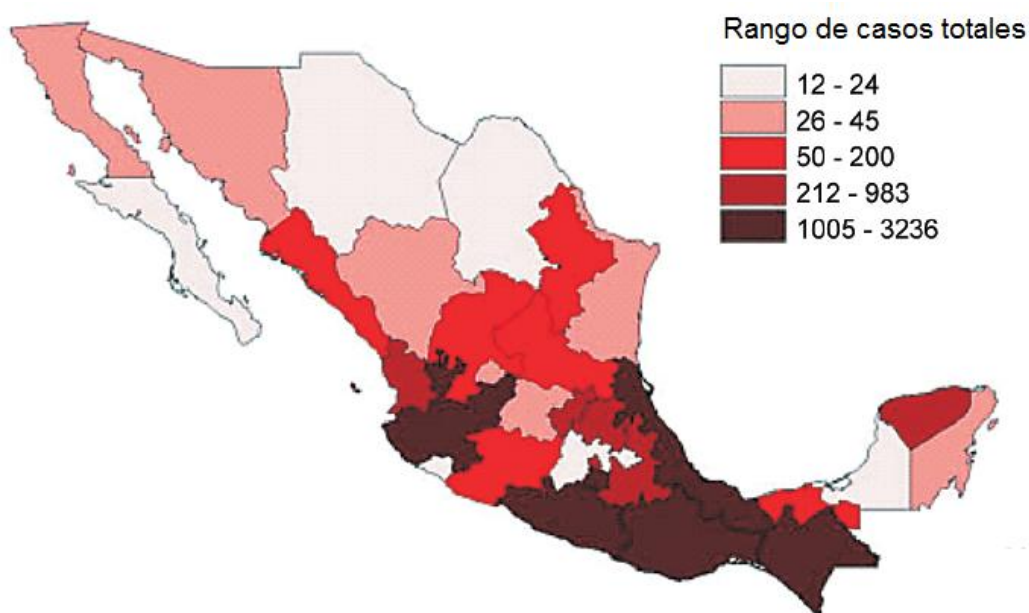


Figura 11. Enfermedad de Chagas en México. En el mapa se muestra el rango total de casos de la enfermedad de Chagas detectados en México para el 2006 por pruebas serológicas, manifestaciones clínica y por transfusiones sanguíneas. Con la escala de color se resaltan los estados con más casos (rojo-oscuro), Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Veracruz, hasta los estados con menos casos reportados (blanco). Imagen tomada de Cruz-Reyes *et al.*, 2006.

Enfocándonos en la diversidad de DTU's encontrada en México, se tienen datos que mencionan al TcI como el principal causante de la enfermedad en humanos reportándolo en estados como Jalisco, Michoacán, Yucatán y Veracruz, además de encontrarse en triatóminos y reservorios (Bosseno *et al.*, 2001, 2006; Ramos-Ligonio *et al.*, 2012). En cuanto a los otros DTU's, todos han sido encontrados en la República Mexicana (Tabla 1) (Fig. 12). Bosseno y colaboradores en 2009 reportaron la presencia del TcII en el

estado de Jalisco en triatóminos además de mapaches, armadillos y didélfidos. Posteriormente, en Michoacán se encontraron los DTU's TcIII y TcIV en triatóminos, siendo este último el segundo más abundante después de TcI en las muestras analizadas (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013). En un estudio más extenso realizado en Campeche se analizaron murciélagos, roedores y didélfidos, reportando diferentes rangos de infección para cada especie (97.4%, 50% y 47.4%, respectivamente), además de triatóminos con presencia de TcI y TcII e infecciones mixtas. En este mismo reporte se informó la presencia de TcVI en dos habitantes de Zoh Laguna, determinado mediante un análisis de haplotipos del gen de mini-exón, siendo este el primer reporte de dicho DTU en México, con principal interés al ser encontrado en humano (López-Cancino *et al.*, 2015).

El estado de Veracruz es considerado una región endémica activa para la infección por *T. cruzi* debido a que se registra la presencia del insecto transmisor infectado, representado por especies con alta capacidad vectorial *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*, además de una amplia variedad de reservorios silvestres como didélfidos, y como ya se mencionó anteriormente, es el primer estado con CCC, además de encontrarse dentro de los primeros cuatro con mayor incidencia de la enfermedad (Ramos-Ligonio *et al.*, 2010; Vallejo *et al.*, 2006). Estudios realizados en Orizaba y Córdoba, Veracruz también han reportado la diversidad de DTU's, Ramos-Ligonio y colaboradores en 2012 analizaron 300 ejemplares de *T. dimidiata* encontrando la presencia de los DTU's TcI al TcV, con este reporte Veracruz se coloca como el estado con mayor diversidad de *T. cruzi*, además de dar a conocer que la transmisión vectorial está presente en el estado con rango de infección en los triatominos de 13.7% (Ramos- Ligonio *et al.*, 2012).

Aparte de este reporte de la diversidad de DTU's presentes en el estado de Veracruz, no hay mayores datos debido a que los estudios se centran en la prevalencia de la enfermedad dejando a un lado la tipificación. Esto último toma importancia ya que existen muchos caso de CCC en adultos e incluso niños, seroprevalencia elevada en comunidades rurales (33.7%) y presencia de infección en bancos de sangre, que podrían ser causados por otros linajes que no-TcI, caso que no se ha explorado desconociendo las afectaciones que estos puede traer a una población de 7 millones de habitantes dentro de las jurisdicciones del estado (Ramos-Ligonio *et al.*, 2010-2012).

Tabla 1. PRESENCIA DE DTU'S EN MÉXICO

DTU	Hospedero	Estado	Técnica	Referencia
TcI	Triatóminos: Tl, Tp, Tpi, Tb, Td, Tn, Tph. Roedores: Pp, Hg, Py, Mm, Sh. Marsupiales: Dv, Dm. Murciélagos: Al, Aj, Sl, Cb, Dp, Sli. Ganado: Oa, Sd. Perros y Humanos	Jalisco, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Colima, Veracruz, Nayarit, Puebla, Campeche, Zacatecas, Michoacán, Guanajuato, Quintana Roo	<ul style="list-style-type: none"> • Mini-exón • Q-PCR mini-exón • 24S α y 18S rRNA • MLEE y RAPDS • Secuenciación del mini-exón 	Bosseno <i>et al.</i> , 2001, 2006, 2009 Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 2006 Sánchez-Guillén <i>et al.</i> , 2006 Brenière <i>et al.</i> , 2007. Gómez-Hernández 2011 Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012 Ibañez-Cervantes <i>et al.</i> , 2013 López-Cancino <i>et al.</i> , 2015 Dorn <i>et al.</i> , 2017
TcII	Triatóminos: Tp, Tl, Tb, Td. Roedores: B, Li, Rf, Mm, Sh. Murciélagos: Mk, Al, Ganado: Oa. Perros	Jalisco, Michoacán Veracruz Campeche	<ul style="list-style-type: none"> • Mini-exón • Q-PCR mini-exón • 24S α y 18S rRNA • RAPDS • Secuenciación mini-exón 	Bosseno <i>et al.</i> , 2001 Bosseno <i>et al.</i> , 2009. Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012 Ibañez-Cervantes <i>et al.</i> , 2013 López-Cancino <i>et al.</i> , 2015
TcIII	Triatóminos: Tp, Tl, Tb, Td.	Michoacán Veracruz	<ul style="list-style-type: none"> • Q-PCR mini-exón • Mini-exón • 24S α y 18S rRNA 	Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012 Ibañez-Cervantes <i>et al.</i> , 2013
TcIV	Triatóminos: Tp, Tl, Tb, Td.	Michoacán Veracruz Quintana Roo	<ul style="list-style-type: none"> • Q-PCR mini-exón • Mini-exón • 24S α y 18S rRNA 	Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012 Ibañez-Cervantes <i>et al.</i> , 2013 Dorn <i>et al.</i> , 2017
TcV	Triatóminos: Td	Veracruz	<ul style="list-style-type: none"> • Mini-exón • 24S α y 18S rRNA 	Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012
TcVI	Humanos	Campeche	<ul style="list-style-type: none"> • Secuenciación mini-exón 	López-Cancino <i>et al.</i> , 2015

Triatóminos: *Triatoma longipennis* (Tl), *T. pallidipennis* (Tp), *T. picturata* (Tpi), *T. barberi* (Tb), *T. dimidiata* (Td), *T. nitida* (Tn), *T. phyllosoma* (Tph).

Roedores: *Peromyscus yucatanicus* (Pp), *P. yucatanicus* (Py), *Heteromys gaumeri* (Hg), *Mus musculus* (Mm), *Sigmodon hispidus* (Sh), *Baiomys* sp. (B), *Liomys irroratus* (Li), *Reithrodontomys fulvescens* (Rf),

Marsupiales: *Didelphis virginiana* (Dv), *D. marsupialis* (Dm).

Murciélagos: *Artibeus lituratus* (Al), *A. jamaicensis* (Aj), *Sturnira ludovici* (Sl), *S. lilium* (Sli), *Carollia brevicauda* (Cb), *Dermanura phaeotis* (Dp), *Myotis keaysi* (Mk)

Ganado: *Ovis aries* (Oa), *Sus domesticus* (Sd).

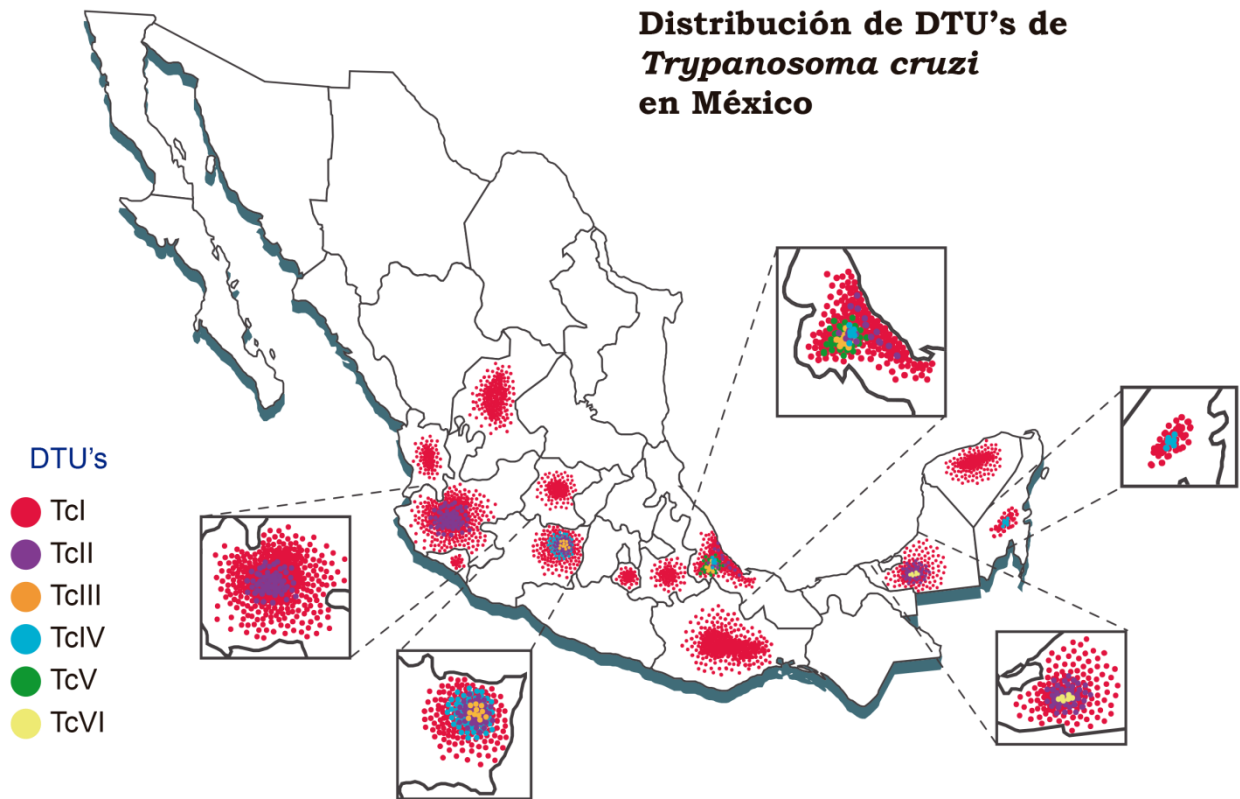


Figura 12. Mapa de la distribución de DTU's de *Trypanosoma cruzi* en México. A partir de una revisión bibliográfica se realizó el mapa donde en diferentes colores se representan los DTU's reportados en los estados de República. En los recuadros se resaltan los estados con mayor diversidad del parásito, comenzando con Veracruz (TcI-TcV), Michoacán (TcI-TcIV), Campeche (TcI, TcII y TcVI), Jalisco (TcI y TcII) y Quintana Roo (TcI y TcVI).

En el laboratorio de Tripanosomiasis Americana del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, se cuenta con la existencia de cinco cepas aisladas de reservorios didélfidos presentes en el estado de Veracruz (CONABIO, 2006), dos de ellas provenientes de *Didelphis virginiana* nombradas Ver 1 (V1) y Ver 6 (V6), otras dos aisladas de *Philander opossum* Ver 3 (V3) y Ver 5 (V5) y una última, Ver 4 (V4) encontrada en *D. marsupialis* (Tabla 2). Estas cepas tuvieron un primer acercamiento con la caracterización genética en el año 2002 por medio de análisis con RADP's, donde se tipificaron a las cepas V4 y V5 dentro del DTU *T. cruzi* I, junto con la cepa de referencia Silvio X10-cl1, mientras que para V3 y V6 no se logró definir el grupo al que pertenecen, ya que a pesar de que ser agrupados dentro del *T. cruzi* II, se encontraron significativamente distantes a las demás cepas dentro de ese grupo (Bosseno *et al.*, 2001). En el laboratorio la estudiante Ángela Downie Ruiz-Velazco (en su estancia semestral de la carrera de Investigación Biomédica Básica) continuó con la caracterización genética de estas cepas realizando el PCR de la subunidad 24S α del rDNA, donde observó que las cepas problema V1, V3 y V6

presentaban un amplificado de 125 pb igual que la cepa de referencia CL-Brener, dicho amplificado corresponde a TcII y TcVI (Fig. 13), mientras que con un amplificado de 110 pb se confirmó que las cepas V4 y V5 pertenecían a TcI. Este estudio no pudo ser concluido pero logró vislumbrar la presencia de DTU's no-TcI en reservorios didélfidos del estado de Veracruz, de los cuales no se tienen reportes, siendo este un hallazgo importante para la diversidad de aquel estado, por si fuera poco uno de los posibles DTU's es el TcVI del cual son escasos los datos.

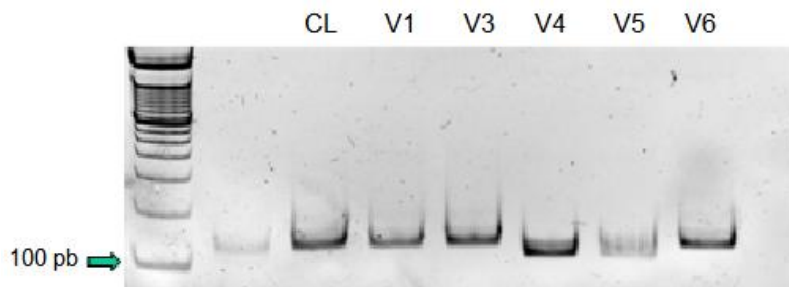


Figura 13. Análisis del gen 24S α del rDNA. Gel de poliacrilamida al 15% donde se analizaron los productos amplificados por PCR del gen 24S α . Carril 1: marcador de peso; carril 3: cepa de referencia TcVI CL-Brener presentando una banda de 125 pb; carril 4-8: las cepas problema V1, V3, V4, V5 y V6. Imagen tomada del informe de Ruiz-Velazco, 2014.

2.2 Variabilidad biológica

Además de la variabilidad genética reconocida en *T. cruzi*, también se sabe que existe una amplia diversidad biológica, y es que, a pesar de que dos cepas pertenezcan al mismo DTU, eso no implica que su comportamiento biológico sea similar. Estudios realizados en el laboratorio demuestran que las cepas Mexicanas Ninoa y Querétaro (Qro) que corresponden ambas al DTU TcI, tienen diferentes grados de virulencia en un modelo murino. La cepa Qro presenta parasitemias significativamente mayores, además de provocar la muerte de entre 60 y 100% de los ratones infectados alrededor del día 18 post infección (dpi), a diferencia de la cepa Ninoa, cuya parasitemia es dos veces menor y no provoca la muerte de los ratones inoculados con ella (Espinoza *et al.*, 2010 y 2011).

Otros estudios han concluido que las cepas pertenecientes al TcI parecen ser más susceptibles a los fármacos tripanosidas y se asocia como ya se dijo, a la enfermedad en humanos con una baja morbilidad. En cuanto a TcII se dice que su resistencia a los fármacos ha incrementado, además de que causa una mayor parasitemia y alta tasa de morbilidad humana. Es sabido que las manifestaciones clínicas y características epidemiológicas pueden variar de acuerdo a la cepa y a la región geográfica además de la genética misma del paciente (WHO, 2007).

El tropismo que presentan las cepas también varía, se ha intentado correlacionar el DTU y su célula blanco pero esto no es claro, ya que existen características propias de la cepa y factores del hospedado que determinan la patología observada. Experimentos de infección con cepas del TcI y TcII demostraron que ambas presentan invasión preferencial al tejido cardiaco, mientras que otro estudio realizado con dos cepas del mismo TcI demuestran que una de ellas invade preferentemente el tejido cardiaco mientras la otra el músculo esquelético (Andrade *et al.*, 2010; Guzmán-Marín *et al.*, 2012); también se ha visto que una misma cepa puede invadir diferentes tejidos en ratones que presentan un fondo genético diferente, por lo que no es fácil hacer una relación DTU/tropismo (WHO, 2002).

Mediante análisis bioquímicos se ha dejado claro que existe una expresión génica diferencial en cada estadio del parásito, lo cual se traduce en una gama de proteínas antigénicas únicas del fenotipo; los epimastigotes están enriquecidos con enzimas metabólicas mientras que los tripomastigotes con proteínas que se asocian a la invasión celular, aunque también existen proteínas que se conservan a lo largo de todos los estadios como la cruzipaina. Estudios en la membrana plasmática del parásito han mostrado glicoproteínas (gp) que son útiles para diagnóstico e identificación del parásito con un peso mayor de 90 kDa presente en los tres estadios, también se identifica una glicoproteína de 72 kDa presente en epimastigotes y tripomastigotes, la cual se reconoce en sueros de personas infectadas independientemente del origen geográfico, igualmente existen proteínas muy inmunodominantes que se proponen como alternativas para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas como la gp80 o gp35/50 (Sánchez *et al.*, 2001; Salazar-Schettino *et al.*, 2006).

Varios estudios reconocen que si una cepa se mantiene por largos periodos de tiempo en medio de cultivo o congeladas sin pasar por cultivo celular o ratones, se puede modificar su capacidad de infección, atenuando su virulencia así como reduciendo su capacidad de producir TM espontáneos, lo que cambiaría el comportamiento de los aislados (Contreras *et al.*, 2006). Para comprobar esto, se realizó un estudio en donde una misma cepa fue mantenida bajo tres condiciones; las primera con pases de vector a ratón, la segunda con pases en ratones recién nacidos y la tercera se mantuvo en medio LIT, lo que se encontró fue que las cepas mantenidas en un modelo murino presentaban una transformación hasta dos veces más que los que se habían mantenido en medio LIT, confirmando que es importante exponer a las cepas al sistema inmune del vector/ratón para que no pierdan virulencia (Contreras *et al.*, 1994). Debido a la diversidad de manifestaciones clínicas así como la complejidad de la patología, es importante enfocarse en factores biológicos y genéticos que nos permitan la comprensión de la patogénesis de la enfermedad de Chagas para poder detener su propagación en los diferentes sectores de la población.

3. JUSTIFICACIÓN

México es considerado un país endémico para la enfermedad de Chagas, donde el linaje TcI de *T. cruzi* es el más abundante en el país con una prevalencia del 96% en cepas analizadas (Bosseno *et al.*, 2001; López-Olmos *et al.*, 1998), aunque, estudios en el humano, el insecto vector y reservorios han demostrado la presencia de los demás DTU's en México (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012, López-Cancino *et al.*, 2015). Debido a esto, es importante la caracterización tanto genética como biológica de las cepas mexicanas de *T. cruzi* del estado de Veracruz, que no corresponden al DTU TcI, ya que aún no se conoce el grado de patogenicidad que estas pueden tener ni sus implicaciones epidemiológicas y clínicas para el humano.

4. OBJETIVOS

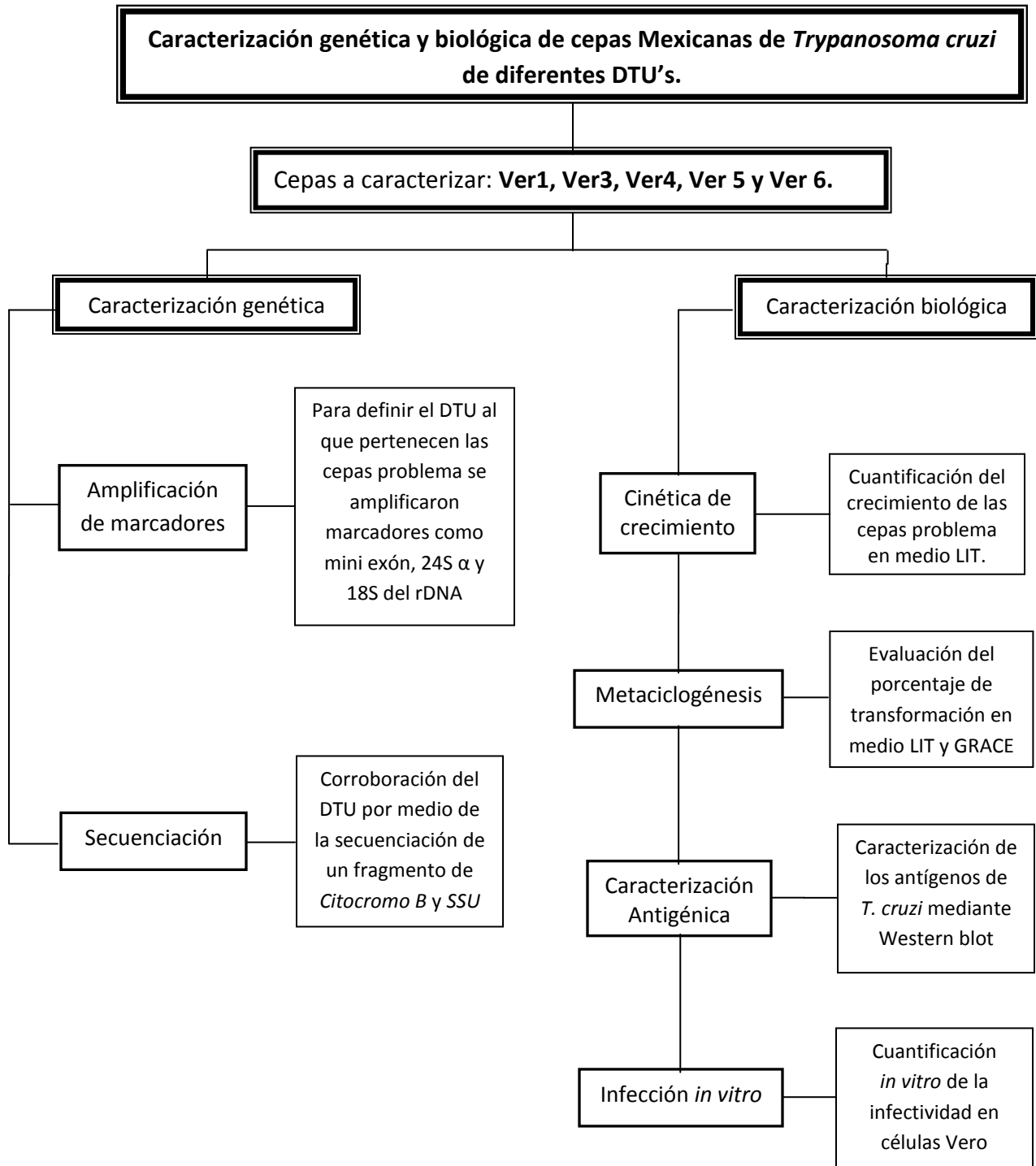
Objetivo General

Realizar la caracterización genética y biológica de las cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de reservorios didélfidos del estado de Veracruz: Ver1, Ver3, Ver4, Ver5 y Ver6.

Objetivos Particulares

1. Caracterización genética de las cepas del estado de Veracruz mediante la secuenciación de marcadores moleculares como mini-exón, 18S del rDNA y un fragmento de citocromo B.
2. Obtención de la cinética de crecimiento de las cepas Mexicanas de *T. cruzi* del estado de Veracruz.
3. Evaluación de metaciclologénesis en la cepas mexicanas de *T. cruzi* del estado de Veracruz por cultivo en diferentes medios inductores de ésta, a través del ensayo de lisis por complemento
4. Comparación antigénica de las cepas del Estado de Veracruz con diferentes sueros contra *T. cruzi*.
5. Cuantificación de la infección *in vitro* de las cepas del estado de Veracruz en células Vero.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Selección de cepas

Parásitos: Para la realización de los experimentos, se utilizaron cepas mexicanas de *T. cruzi* del estado de Veracruz, aisladas de reservorios marsupiales denominadas Ver1, Ver 3, Ver4, Ver5 y Ver6, así como cepas de referencia Querétaro, Ninoa y CL-Brener provenientes de diferente origen biológico (Tabla 2). Los parásitos se mantuvieron creciendo en cajas de cultivo de 25 cm² a una concentración de 2x10⁶ parásitos/mL (p/mL) en 5 mL de medio LIT (NaCl 68 mM, KCl 5.36 mM, NA₂HPO₄53.6 mM, Glucosa 1 mM, Triptosa, e Infusión de caldo de hígado), complementado con 10% de SFB inactivado y 25 µg/µL de hemina, incubados a 28°C, de donde se tomaban los parásitos necesarios para realizar los experimentos posteriores.

Tabla 2. ORIGEN GEOGRÁFICO Y BIOLÓGICO DE LAS CEPAS.

Clave	Cepa	Estado	Origen biológico
MDID/MX/1991/VER001	Ver 1	Veracruz	<i>Didelphis virginiana</i>
MDID/MX/1991/VER003	Ver 3	Veracruz	<i>Philander opossum</i>
MDID/MX/1991/VER004	Ver 4	Veracruz	<i>Didelphis marsupialis</i>
MDID/MX/1989/VER005	Ver 5	Veracruz	<i>Philander opossum</i>
MDID/MX/1991/VER006	Ver 6	Veracruz	<i>Didelphis virginiana</i>
TBAR/MX/0000/Querétaro	Querétaro (Qro)	Querétaro	<i>Triatoma barberi</i>
MHOM/MX/1994/Ninoa	Ninoa	Oaxaca	<i>Homo sapiens</i>
TINF/BR/1963/CL-Brener	CL-Brener	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>

6.2 Caracterización genética

6.2.1 Extracción de DNA de *T. cruzi*

La obtención de DNA genómico de las cepas del estado de Veracruz así como de Qro, Ninoa y CL-Brener, se llevó a cabo con el método de fenol-cloroformo. Los parásitos fueron contados en una dilución 1:50 en la cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico. Cada cultivo, no mayor a 1x10⁹ parásitos, se pasó a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos a 27°C, se decantó el medio y se realizaron 2 lavados con PBS estéril, centrifugando de la misma manera. Al botón celular se le agregó 1 mL de buffer de lisis (NaCl 80 mM; EDTA 45 mM pH 8; SDS 1%) sin exceder los 1x10⁹ p/mL de buffer. El lisado celular fue fraccionado en dos partes iguales colocándolo en tubos eppendorf de 1.5 mL, para agitar en vórtex por 30 segundos a 120 volts (V). A cada volumen de lisado se le colocaron 2.5 µL de proteinasa K 20 mg/mL (Sigma P-8044), para

tener una concentración final de 0.1 mg/mL de proteinasa, se agitó con inversión cada tubo y se incubó toda la noche a 37°C en un horno de calor seco (Incubador L-C, mod 203). Pasada la incubación se agregó un volumen (500 µL) de fenol saturado por tubo (Sigma P-4557) y nuevamente se agitaron por inversión hasta obtener una emulsión. La solución resultante fue centrifugada durante 10 minutos a 12,800 g a 4°C en una centrifuga Eppendorf-5410. La fase acuosa superior fue recuperada, colocando 450 µL, en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, para después adicionar 450 µL (1 volumen) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 Sigma P-2064) y se agitaron por inversión suavemente hasta obtener una emulsión. A continuación se centrifugaron las mezclas nuevamente a 12,800 g por 10 minutos a 4°C recuperando la fase acuosa en un tubo estéril de 1.5 mL, sin exceder los 500 µL por tubo. Posteriormente, se añadieron por tubo, 2 volúmenes y medio (1000 µL aprox.) de etanol (Sigma E-7023) frío, agitando suavemente por inversión para precipitar el DNA, dejándolo que se precipitar a -20°C durante toda la noche. Para finalizar, los viales fueron centrifugaros por 12 minutos a 12,800 g a 4°C para obtener un botón de DNA. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente sin tocar el botón de DNA y éste se resuspendió en etanol al 70% para centrifugar como se mencionó anteriormente. Por último, se eliminó el sobrenadante y se dejó evaporar las trazas de etanol, una vez que no se observó líquido en la base del tubo se le adicionaron 150 µL de agua milli-Q estéril para disolver el DNA. Éste fue almacenando a -20°C hasta su uso.

6.2.2 Cuantificación de DNA genómico

Se llevó a cabo la cuantificación de DNA de las muestras del estado de Veracruz, Qro y Cl-Brener en el Nano Drope ND-1000 Spectrophotometer a 230nm, tomando 2 µL de cada muestra para medir la concentración de DNA ng/µL. Se anotaron los valores de 260/280 (entre 1.6-2 para proteínas) y 260/230 (entre 1.5-2.2 para carbohidratos) para ver la pureza de las muestras.

6.2.3 Amplificación del gen de mini-exón por PCR punto final

El PCR de mini-exón amplifica la región intergénica no transcrita, repetida en tándem, de este gen utilizando un set de 3 primers TC, TC1, y TC2 (Tabla 3). Las condiciones de reacción fueron 50 ng/µL de DNA total de las muestras del estado de Veracruz así como los controles Qro y Cl-Brener. En un volumen final de 25 µL que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada primer, 100 µM de cada dNTP y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen 10966-030). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100, MJ Researche, INC. Teniendo como primer paso una

desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 27 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C) con un paso de elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 1 hora, en buffer TBE 0.5X (Tris .11 M, ácido Bórico 90mM, EDTA 0.5M). El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y fue visualizado bajo luz UV (Brisse *et al.*, 2001).

6.2.4 Amplificación de subunidad 18S del rDNA por PCR punto final

La amplificación por PCR del dominio de tamaño variable 18S del rDNA se realizó utilizando los primers V1 y V2 (Tabla 3), los cuales tienen como blanco el dominio en la posición 994 (3') y 1164 (5') de la cepa Perú. Las condiciones de amplificación se realizaron tomando 50 ng/μL de DNA total de las muestras del estado de Veracruz así como los controles de DTU: Qro (Tcl) y Cl-Brener (TcVI). El volumen final de 25 μL contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 9, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 200 nM de cada primer, 100 μM de cada dNTP y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen 10966-030). Sometidos a ciclos de amplificación con una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos seguido de 30 ciclos (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C) y por último una elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 100 V durante 1.30 horas, en buffer TBE. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y fue visualizado bajo luz UV (Brisse *et al.*, 2001).

6.2.5 Amplificación de un fragmento del citocromo B de *T. cruzi*

La amplificación de la región codificante del Citocromo B de *T. cruzi* se realizó utilizando los primers p18 y p20 (Tabla 3), los cuales fueron diseñados de la secuencia de 5736 nucleótidos de la cepa Tulahuen TRCKPMAX (Gen-Bank U43567) para amplificar un fragmento del gen en la parte 5' (Brisse *et al.*, 2003). La mezcla de reacción se realizó con 200 ng/μL de DNA para tener una banda con más amplificado de las muestras del estado de Veracruz así como nuestros controles de DTU: Qro (Tcl) y Cl-Brener (TcVI). En un volumen final de 60 μL que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 200 nM de cada primer, 100 μM de cada dNTP y 0.9 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen 10966-030). El ciclado para este gen consistió en un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos (1 minuto a 94°C, 30 segundos a 50°C, 90 segundos a 72°C) para terminar un paso de elongación a 72°C por 5 minutos. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.6% a 100 V

durante 30 minutos en buffer TAE. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y fue visualizado bajo luz UV (Barnabé *et al.*, 2003).

6.2.6 Amplificación del un fragmento de la SSU del rDNA

La amplificación de una secuencia parcial de la región V7-V8 de la subunidad menor del rDNA (SSU) se realizó con los primers 609F y 706R (Tabla 3) (Da Silva *et al.*, 2004b; Marcili *et al.*, 2009), modificando la mezcla de reacción reportada por Da Silva 2004, utilizando las mismas condiciones de *CytB* mencionadas anteriormente. Las muestras amplificadas fueron las del estado de Veracruz así como de los controles de DTU: Qro (Tcl) y Cl-Brener (TcVI). El ciclado para este fragmento consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (1 minuto a 94°C, 2 minutos a 48°C y 1 minuto a 72°C). Los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 30 minutos en buffer TAE. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y fue visualizado bajo luz UV.

Tabla 3. INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE DIFERENTES SECUENCIAS DE *T. CRUZI*.

Gen	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplificado esperado	Temperatura de alineamiento
Mini-exón	ME	TC (5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3') TC1 (5'-GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC-3') TC2 (5'-CCT GCA GGCACA CGT GTG TGT G-3')	300 pb 350 pb	55°C
Subunidad 18S rDNA	18S rDNA	V1 (5'-CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA-3') V2 (5'-TTG AGG GAA GGC ATG ACA CATGT-3')	175 pb 165 pb 155 pb	55°C
Fragmento Citocromo B	<i>CytB</i>	p18 (5'-GAC AGG ATT GAG AAG CGA GAG AG-3') p20 (5'-CAA ACC TAT CAC AAA AAG CAT CTG-3')	710 pb	50°C
Fragmento de SSU	SSU	609F (5'-CAC CC GCG GTA ATT CCA GC- 3') 706R (5'-CTG AGA CTG TAA CCT CAA- 3')	900 pb	48°C

6.2.7 Secuenciación del fragmento de *CytB* y de la SSU del rDNA

La secuenciación de los fragmentos amplificados del citocromo B así como de la SSU del rDNA, se llevó a cabo con la colaboración de Patricia de la Torre del laboratorio del Dr. Juan Pedro Laclette, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las mezclas de reacción se secuenciaron por medio del Kit Big Bye Terminator V3.1 Applied Biosystems, utilizando Genetic Analyzer 3500 XL Applied Biosystems para el análisis, bajo el fundamento de la técnica de Sanger (De Necochea y Canul, 2004).

6.2.8 Análisis de las secuencias de citocromo B y SSU del rDNA

La verificación del cromatograma de las secuencias se llevó a cabo con el software FinchTV versión 7.1 (Descargado de: http://descargar.cnet.com/FinchTV/3000-2054_4-10289087.html). El alineamiento previo de las secuencias forward (Fw) y reverse (Rv) así como la obtención del complemento reverso de la secuencia Rv se llevó a cabo con el programa BioEdit (Descargado de: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), los alineamientos finales, el recorte de las secuencias y árboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7 (Descargado de: <http://www.megasoftware.net>) obteniendo modelo de sustitución y utilizando el de menor BIC, bajo el método de Máxima verosimilitud con 10, 000 repeticiones de bootstrap.

6.3 Caracterización biológica

6.3.1 Cinética de crecimiento

En este ensayo los parásitos se cultivaron en una botella de cultivo de 25cm² con 5 mL de medio LIT complementado como ya se mencionó, en una concentración de 2x10⁶ p/mL, al igual que la cepa control Qro. La cuantificación del crecimiento de las cepas se realizó cada dos días, tomando una alícuota de 10 µL del cultivo a evaluar y colocándola en un tubo eppendorf de 1.5 mL con PBS pH 7 (Phosphate Buffered Saline; 137 mM NaCl, 10 mM phosphato, 2.7 mM KCl) para realizar una dilución dependiente del crecimiento, partiendo de 1:20 hasta 1:60 (parásitos/PBS). Las muestras de cada cepa se colocaron en la cámara de Neubauer (Fig. 14), observando 10 µL de cada dilución para contar los parásitos bajo el microscopio óptico Reichert U.S.A a 40X. De los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer se contabilizaron 16 cuadros totales de forma diagonal. Finalmente, para obtener el número de parásitos encontrados en 1 mL de medio de cultivo se utilizó la siguiente fórmula:

N° x 10 x 1000 x "X" = N° parásitos

N° (parásitos contados en los 16 cuadros)	X	10 (volumen en µL colocados en la cámara de Neubauer)	X	1000 (factor de conversión a mL)	X	X (factor de dilución utilizado)	=	N° de parásitos por mL de cultivo
---	----------	--	----------	--	----------	--	----------	--------------------------------------

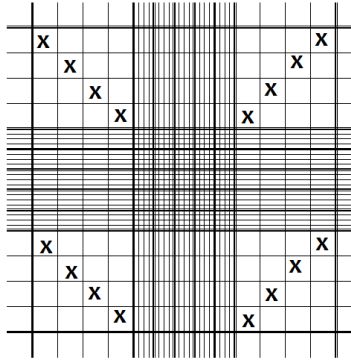


Figura 14. Cámara de conteo Neubauer para conteo celular. Con la “x” se marcan los cuadrados contados para cada una de las muestras cuantificadas, por duplicado. Imagen tomada del internet y modificada https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid_256436846.

6.3.2 Inducción de metaciclologénesis

La inducción de la metaciclologénesis se llevó a cabo de dos maneras para las cepas del estado de Veracruz y Qro. De manera espontánea, donde los parásitos epimastigotes fueron sembrados en medio LIT complementado en una concentración de 5×10^6 p/mL en 8 mL y se dejaron envejecer durante 11 y 14 días para obtener TM espontáneos. La otra forma fue a través del medio GRACE (Gibco, Cat. 11300-043), se realizó partiendo de un cultivo de epimastigotes sembrado en una concentración de 5×10^6 p/mL en 20 mL de medio LIT complementado. En el día 9 de cultivo las cepas evaluadas se homogeneizaron y se contaron en una dilución 1:50 en la cámara de Neubauer, como ya se mencionó. Posteriormente, el cultivo se pasó a tubos cónicos de 50 mL donde fue centrifugado a 2000g por 15 minutos a 4°C, para retirar el medio LIT del botón de parásitos, continuando con dos lavados usando PBS estéril, centrifugando de la misma manera. El botón restante se resuspendió en medio GRACE sin SFB, y nuevamente se contaron los parásitos en una dilución 1:100 en la cámara de Neubauer, para llevarlos a una concentración de 250×10^6 p/mL. El cultivo se dejó incubando en posición horizontal por 7 días a 28°C.

6.3.3 Lisis por complemento

El ensayo se realizó partiendo de un cultivo de parásitos de las cepas del estado de Veracruz y Qro., sembrado en medio LIT envejecida (día 11 y 14) y en medio GRACE a una concentración de 250×10^6 parásitos/mL en su día 7 de crecimiento. Los parásitos en ambas condiciones fueron homogeneizados para contarse en una dilución 1:100 en la cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico. A continuación cada cepa se ajustó a una

concentración de 5.1×10^6 parásitos en 510 μL del medio correspondiente, dividiéndose en 3, colocando 170 μL en diferentes tubos eppendorf. Para evaluar la lisis de los parásitos no resistentes, estos se incubaron con suero de cobayo como fuente de complemento. Las condiciones que se evaluaron con cada cepa fueron: suero congelado sin desactivar, suero inactivo (56°C por 30 min.) y medio LIT ó GRACE. A las alícuotas de parásitos se le agregaron 170 μL de suero o medio para tener tres condiciones, y se dividieron en 3 tubos con 100 μL , teniendo así triplicados de cada condición. Una vez hechas las alícuotas se dejaron incubando a 28°C por una hora. Pasada la incubación se realizaron diluciones de cada una de las alícuotas, 1:10 (10 μL de parásitos + 90 μL de PBS), para contar la sobrevivencia de los parásitos en el suero no desactivado y compararla con la de los controles.

6.3.4 Infección in vitro en células Vero

La infección de la línea celular epitelial VERO, aislada de riñón del mono verde, se llevó a cabo con TM obtenidos por medio GRACE como se describió anteriormente. Las células se sembraron en laminillas con 21 pozos (Electron Microscopy Sciences, Cat. 63429-04) donde se colocaron 6,000 células en 30 μL por pozo y se dejaron adherir toda la noche en medio DMEM con 10% de SFB, humedad relativa a 37°C y 5% de CO_2 . Los parásitos se colectaron en tubos falcon de 15 mL y se centrifugaron a 2,500 g por 10 minutos a 25°C , el botón celular se resuspendió en 2 mL de medio GRACE y se tomaron 0.5 mL de cada cepa más 0.5 mL de suero de cobayo fresco (1:1) dejando incubar a 27°C durante 1 hora. Los TM resistentes a la lisis por complemento se centrifugaron nuevamente como ya se mencionó y se resuspendieron en 1 mL de PBS estéril para ser purificados por un gradiente de Percoll (Pharmacia Biot, Cat. 17-0891-01) donde se colocaron de mayor a menor concentraciones de 80%, 40% y 15% de percoll y por último los parásitos lentamente. Este gradiente discontinuo se centrifugó a 15°C por 30 minutos a 3,300 g con una aceleración de 7 y desaceleración de 1 (Centrífuga Allegra X-30). La banda formada en el percoll al 80% se colectó con ayuda de una micropipeta de 200 μL y se colocó en un tubo de 15 mL + 9 mL de PBS estéril para lavar centrifugando a 4,000g por 30 minutos a 15°C . Finalmente, el botón de tripomastigotes se resuspendió en 1 mL de DMEM fresco y se contaron los parásitos para infectar a las células en razón 1 célula: 15 TM durante 6 horas. Pasado el tiempo de infección las células se lavaron en dos ocasiones con PBS y se fijaron con metanol al 90% durante 6 minutos. La tinción se llevó a cabo con 20 μL de DAPI (Invitrogen, D1306) 50 μM durante 20 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo se lavó dos veces con agua bidestilada y se fijó para su observación con una solución 1:1 de PBS/Glicerol con 0.125% de azida de sodio. La laminilla se observó al microscopio

invertido Olympus IX71 bajo una longitud de onda entre 350-460 nm con un filtro azul-cian para ver la fluorescencia con el objetivo de 40x, se fotografiaron varios campos por pozo para poder contar como mínimo 150 células por cepa.

6.4 Caracterización antigénica

6.4.1 Obtención de extractos proteico por medio de sonicación

Los extractos proteicos se realizaron partiendo de un cultivo de 20 mL de epimastigotes con una concentración de 5×10^6 p/mL en medio LIT complementado, con las cepas del estado de Veracruz, además con las cepas Qro y Ninoa como control. Los parásitos se cosecharon al día 4 de cultivo, con una densidad entre 40-60 $\times 10^6$ p/mL, en tubos cónicos de 50 mL para ser centrifugados a 2000g por 10 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en PBS estéril y se pasó a tubos cónicos de 15 mL, se lavó 2 veces con PBS pH 7.2 centrifugando a 2000g por 10 min a 4°C, para quitar el excedente de medio LIT. Se retiró el sobrenadante y se pesó el botón obtenido en cada cepa (peso húmedo), posteriormente éste se re suspendió en 5 mL de buffer Tris HCl 10 mM pH 8.2 por gramo húmedo de parásitos y se añadieron los inhibidores de proteasas (Tabla 4). Las muestras se sonicaron en un sonicador modelo vibracell (Sonic & Materials, USA) a 100 watts con intervalos de 1.5 segundos durante 4 minutos y se agitaron por un minuto en vórtex a 120v, por 4 ocasiones cada muestra. Para finalizar, se centrifugó la muestra sonicada a 10,000g por 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se almacenó a -20°C.

Tabla 4. CONCENTRACIÓN DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS

Inhibidores	Concentración stock	Estabilidad	μ L agregados por 5 mL de buffer	Concentración final
EDTA (Sigma E-9884)	0.5 M	Meses a 4°C	125 μ L	12 μ M
PMSF (Sigma P7626)	200 mM	9 meses a 4°C	25 μ L	1 mM
Leupeptin (Sigma L-2884)	10 mM	1 mes a -20°C	50 μ L	100 μ M
Pepstatin (Sigma P-4264)	1 mM	Meses a -20°C	5 μ L	1 μ M

6.4.2 Cuantificación proteínas

Los extractos proteicos de cada cepa fueron cuantificados por el método de Lowry utilizando el kit DC Protein assay (BIO-RAD, 500-0114), con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma A-5503), realizada con concentraciones conocidas de ésta, leyendo su absorbancia a 655 nm en un Microplate Reader 550, BIO-RAD.

6.4.3 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

Se utilizaron los extractos proteicos realizados por sonicación de epimastigotes de las cepas del estado de Veracruz así como de Qro y Ninoa. Las muestras se prepararon tomando 10 µg de cada extracto proteico, añadiendo 2µL de buffer 1X para proteínas (1% SDS, azul de bromofenol, 6% β-mercaptol) y llevándolos a un volumen final de 8µL con PBS. Cada muestra se hirvió durante 5 minutos. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS/PAGE) al 12% (30% acrilamida-8% bisacrilamida, Tris-HCl/SDS pH 8.8, sulfato de amonio, TEMED y agua bidestilada) con un grosor de 0.75 mm en presencia de buffer Dodecil Sulfato de Sodio (SDS 10%) 1X. Por gel se colocaron 2 µL de marcador de peso molecular para proteínas Protein Ladder (BIO-RAD 10748-010), y se corrieron a 170V por una hora veinte minutos. Se realizaron geles para tener el perfil proteico de las cepas a evaluar, los cuales se tiñeron con azul de Coomasie (0.025 % Coomasie blue G-250; BIO-RAD 161-0406, 10% ácido acético) durante 15 minutos, se lavaron con agua bidestilada y se dejaron en una solución desteñidora (30% metanol, 10% ácido acético y 60% agua bidestilada) toda la noche (O/N).

6.4.4 Western Blot

Las proteínas de las diferentes cepas corridas en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20µm) a 100v por una hora diez minutos, utilizando buffer de transferencias (Tris base 0.025 M, glicina 0.2 M y metanol 20%). Las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma P7170), para verificar que la transferencia se haya llevado a cabo correctamente y se destiñó con PBS durante 1 hora. Posteriormente, las membranas se dejaron bloqueando toda la noche con leche descremada 10% (Svelty, Nestle) en PBS en agitación constante a 4°C. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con los sueros específicos anti-*T. cruzi* y los sueros controles a las concentraciones indicadas (Tabla 5), diluidos en leche descremada al 10% en PBS, a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación baja. Para quitar el

excedente de suero la membrana se lavó con PBS-Tween 20 (Sigma, P-1379) al 0.1% durante 5 minutos en agitación fuerte. Una vez retiradas las trazas de suero, se agregó el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBS-Tween20 (Tabla 5) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación baja. Finalmente, la membrana se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1% durante 5 minutos en agitación fuerte, para quitar las trazas del anticuerpo secundario, y se reveló durante 30 segundos con 3-3 diamino bencidina 0.5 mg/mL (Sigma, D-5637) con PBS y 0.02% de H₂O₂, deteniendo la reacción con agua bidestilada (por suero se realizaron de 2-3 experimentos independientes).

Tabla 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUEROS UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS DE WESTERN BLOT.

Anticuerpo primario (suero)	Características	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Suero de ratón* infectado con tripomastigotes de la cepa Qro de <i>T. cruzi</i>	Pool de sueros obtenidos 18 d.p.i.	1:25	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma A9044)	1:1000
Suero de ratón* infectado con tripomastigotes de la cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i>	Pool de sueros obtenidos 28 d.p.i.	1:25	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma A9044)	1:1000
Suero de ratón* sin infectar (control -).	Pool de sueros obtenidos a las 10 semanas de edad.	1:25	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma A9044)	1:1000
Suero humano usado como control + en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	Suero comercial CHAT 2 gli (1:1).	1:500	HRP anti-IgG humana (Zymed 8171-20)	1:10,000
Suero de humano sin enfermedad de Chagas (control -)	Pool de sueros: CN115; CN227; CN309; CN226. (-) gli (1:1).	1:500	HRP anti-IgG humana (Zymed 8171-20)	1:10,000
Suero de conejo inmunizado con tripomastigotes de la cepa Qro de <i>T. cruzi</i> .	Pool de sueros gli (1:1)	1:1000	HRP anti-IgG rabbit (Sigma A10547)	1:2000

*Ratones Balb-C, hembras (♀), sangrados intracardiamente en el periodo de tiempo mencionado.

6.5 Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado por lo que en los resultados se muestra el promedio de cada ensayo más su desviación estándar. Para encontrar diferencias estadísticas se realizaron pruebas como ANOVA de una vía, así como la prueba post-hoc de Tukey para comprobar entre que grupos existen esas diferencias.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización genética

Para poder definir el grupo genético al que pertenecen las cepas aisladas de reservorios del estado de Veracruz V1, V3, V4, V5 y V6, se utilizaron varios marcadores moleculares. Siguiendo el esquema de tipificación que aparece en la figura 6, se realizó el PCR de mini-exón como confirmatorio donde se dividen las cepas problema en dos grandes grupos. Como se esperaba las cepas V4 y V5 presentan el amplificado del DTU TcI de 350 pb al igual que la cepa control Qro, mientras que las cepas V1, V3 y V6 amplificaron 300 pb correspondiente a cepas no TcI como CL-Brener (TcVI) (Fig. 15).

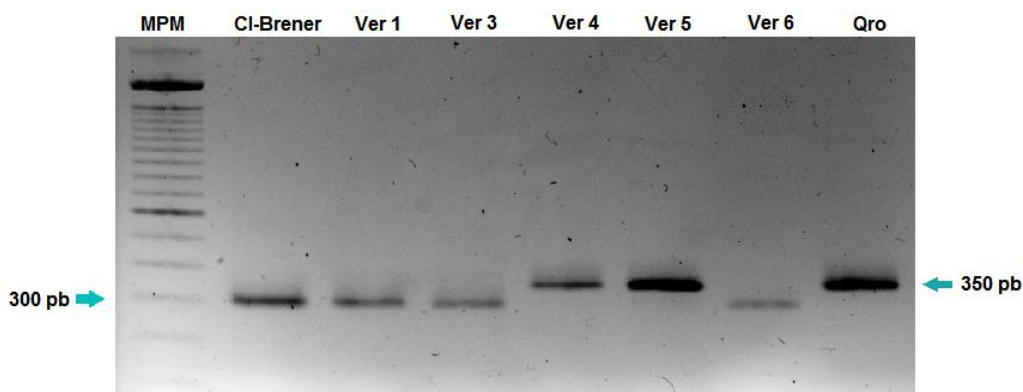


Figura 15. Caracterización de las cepas del estado de Veracruz por medio del marcador mini-exón. Se realizó un PCR utilizando los iniciadores TC, TC1 y TC2. Los productos del PCR se corrieron en gel de agarosa al 1.5% cargando por muestra 10 μ L de amplificado, tanto de las muestras problema como las cepas tipo TcVI (CL-Brener) y TcI (Qro). Marcadores de peso molecular (MPM).

Continuando con el esquema de tipificación y tomando en cuenta los resultados obtenidos por Ángela Downie, estudiante del laboratorio que inició la caracterización de las cepas con el marcador 24S α del rDNA, se discriminó los DTU's a los que podrían pertenecer nuestras cepas problema V1, V3 y V6, con un amplificado de 125 pb que correspondería a TcII o TcVI. Finalmente, para establecer con más precisión el DTU al que pertenecen las cepas del estado de Veracruz se realizó el PCR de las subunidad 18S del rDNA. Para las cepas pertenecientes al TcI, V4 y V5, se observó el amplificado esperado de 175 pb, junto con la cepa de referencia Qro, además de varios amplificados menores que ya se ha reportado con este marcador. En el caso de nuestra cepa de referencia TcVI se

observó un amplificado de 165 pb, las cepas problema V1, V3 y V6 presentaron el amplificado dominante de 165 pb, además de otros amplificados similares a CL-Brener, pero al no contar con la cepa de referencias TcII para discriminar se decidió secuenciar genes del parásito (Fig. 16).

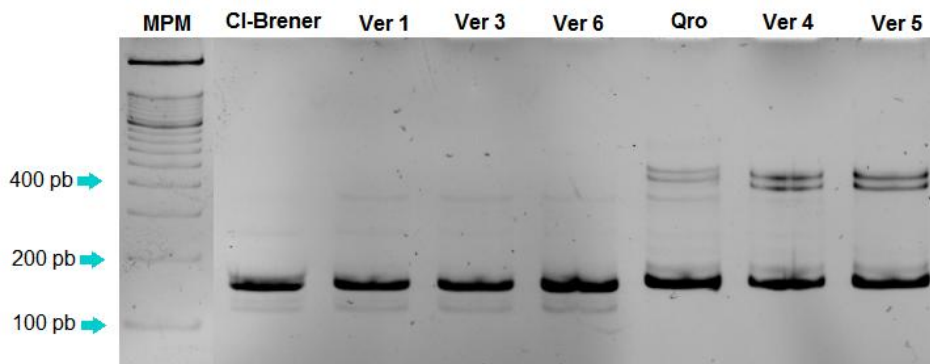


Figura 16. Caracterización de DTU's con el gen 18S del rDNA. Se realizó un PCR utilizando los iniciadores p18 y p20. Los amplificados se analizaron en gel de agarosa al 3% colocando por carril 10 μ L de amplificado, tanto de las cepas problema como de las cepas tipo TcVI (CL-Brener) y TcI (Qro). Marcador de peso molecular (MPM).

Finalmente, para esclarecer el DTU al que corresponden nuestras cepas problema V1, V3 y V6 se realizó la secuenciación de un fragmento mitocondrial de Citocromo B (*CytB*) y un fragmento nuclear de la subunidad menor del rDNA (*SSU*).

Como resultado del PCR para el gen de *CytB* se obtuvo un amplificado de 710 pb para todas las cepas (Fig. 17), el cual se secuenció en ambas direcciones (Fw y Rv), las secuencias resultantes de 473 pb se revisaron y se alinearon en el programa MEGA 7 con secuencias de cepas de referencia encontradas en Gen Bank para cada uno de los seis DTU's, además de dos grupos externos (*T. cruzi marinkellei*, *Leishmania major*). Como resultado del alineamiento de las cepas del estado de Veracruz V1, V3, V4, V5 y V6, con dos cepas de referencia, TcI (Silvio X10 cl1) y TcVI (CL-Brener), se obtuvo que las cepas V1, V3 y V6 son idénticas a la cepa CL-Brener, mientras que V4 y V5 solo difieren en una base a Silvio X10 cl1, la similitud entre estos DTU's fue de 93.44% (Anexos 1).

Para obtener el árbol filogenético en este trabajo se realizó un alineamiento global con 19 cepas de referencias pertenecientes a distintos DTU's (Tabla 6), el análisis con el programa MEGA 7 arrojó como resultado que el modelo de sustitución adecuado para realizar el árbol es Tamura-Nei (TN93), ya que es el que presentaba el BIC más bajo (3331.75), y bajo el método de máxima verosimilitud se obtuvo un árbol con tres clados principales A, B y C (Fig. 18). El clado A está representado por las cepas del DTU TcI donde se encuentran agrupados, como se esperaba, los aislados V4 y V5 con un valor de soporte de 100% de bootstrap. En el clado C se agrupan las cepas pertenecientes al DTU TcII y como se puede observar éste es un grupo muy definido que igualmente presenta un bootstrap de 100%, siendo un grupo muy homogéneo donde solo se encuentran las cepas de referencia correspondientes al linaje dos. El clado B, está conformado por las cepas correspondiente a los DTU's TcIII a TcVI, este clado se conoce como híbrido debido al origen de las cepas pertenecientes al TcIV, TcV y TcVI (como ya se mencionó). Como se puede ver, esta rama tiene un valor de soporte de 98%, con otras ramas internas, una de ellas donde se agrupan mayoritariamente las TcIII y otra rama donde se agrupan nuestras cepas problema V1, V3 y V6 con los híbridos. Este resultado indicaría que corresponden al TcVI ya que se encuentran dentro del clado híbrido y no en el clado bien definido para el TcII (Fig. 18).

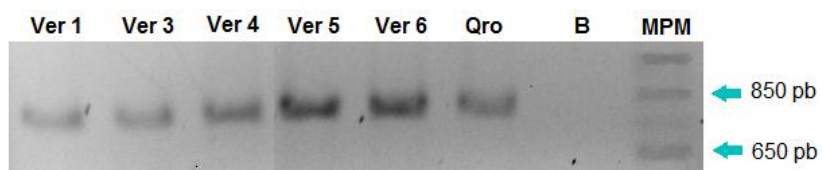


Figura 17. Fragmento del gen de Citocromo B de *T. cruzi*. Se realizó un PCR con los iniciadores p18 y p20, los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1.6% colocando 10 μ L por pozo, tanto de las cepas del estado de Veracruz y nuestro control TcI (Qro). Blanco (B) (mezcla de reacción y agua estéril), marcador de peso molecular (MPM).

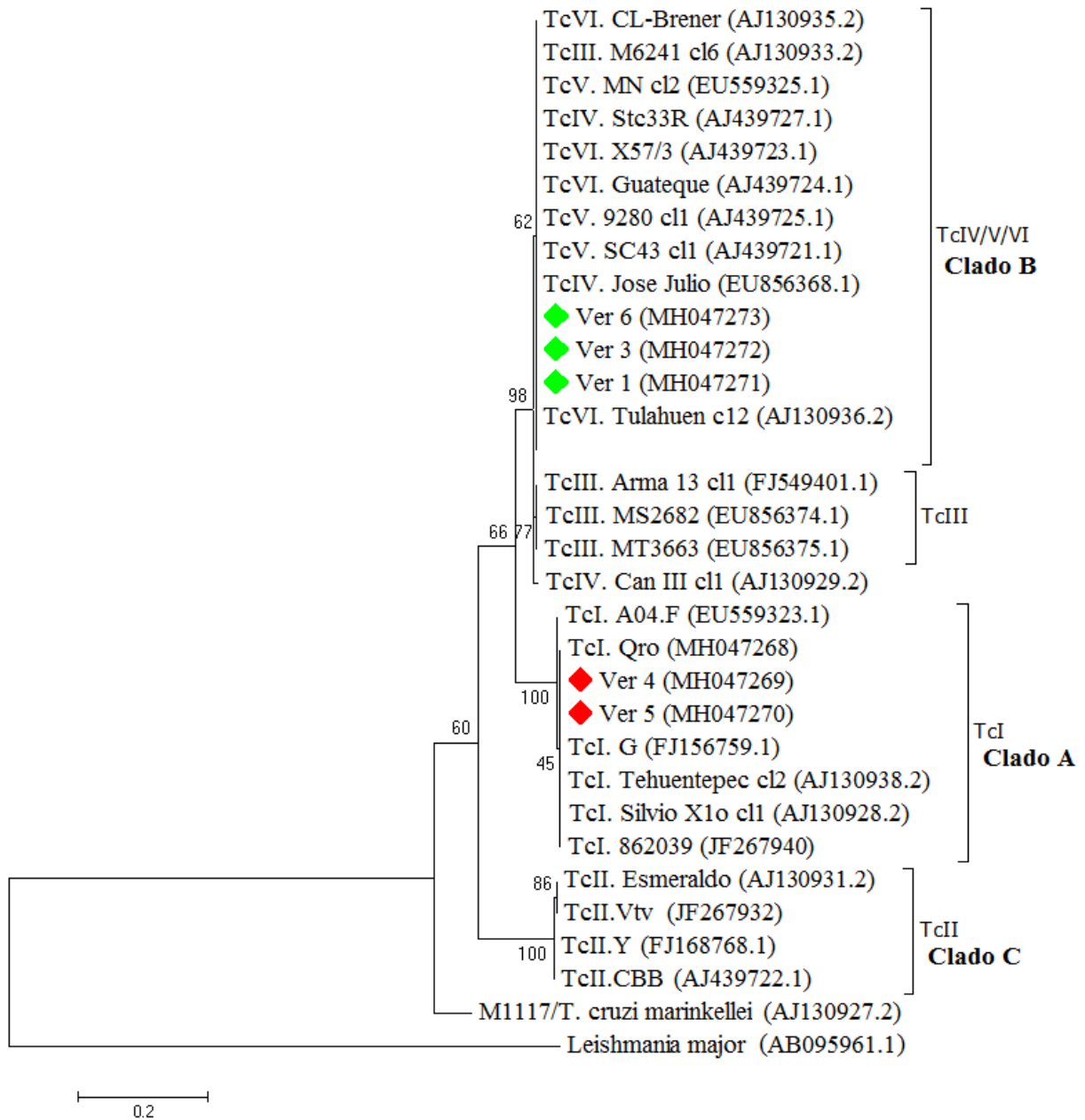


Figura 18. Árbol filogenético inferido por Máxima verosimilitud con datos de Citocromo B de 29 secuencias de aislados de *T. cruzi*, *T. marinkellei* y *L. major*. El modelo de sustitución utilizado fue Tamura-Nei alineando 473 pb que permitieron observar tres clados resultantes (A, B y C), los valores de bootstrap son derivados de 10 000 réplicas realizadas. Las cepas problema V1, V3 y V6 (diamante morado) se agruparon en el clado B, con las cepas híbridas mientras que las cepas Ver 4 y 5 (rombos rojos) se agruparon en el clado A, homogéneo para TcI.

Para terminar el análisis de las cepas problema V1, V3 y V6 fue necesario utilizar un marcador nuclear que eliminara la posibilidad de que estas cepas pertenecieran a otro grupo híbrido que no fuera TcVI, para ello se amplificó un fragmento del gen *SSU* de 900 pb para todas las cepas (Fig. 19).

El fragmento obtenido fue secuenciado en ambas direcciones (Fw y Rv), y las secuencias resultantes se alinearon con el programa MEGA 7 utilizando dos cepas de referencias TcI (G) y TcVI (CL-Brener). En los alineamientos de 847 pb para las cepas de interés muestra un 94.96% de similitud entre los diferentes DTU's, encontrándose 46 sitios diferentes (la cepa V1 no se utilizó para este análisis), igualmente se encontraron varios GAP's compartidos y cambios en los pares de bases por grupo genético. La secuenciación de este gen *SSU* fue más compleja y no se pudo obtener completa en todos los casos (como se observa para la cepa Ver 1), aunque el fragmento disponible fue suficiente para realizar el análisis filogenético (Anexo 2).

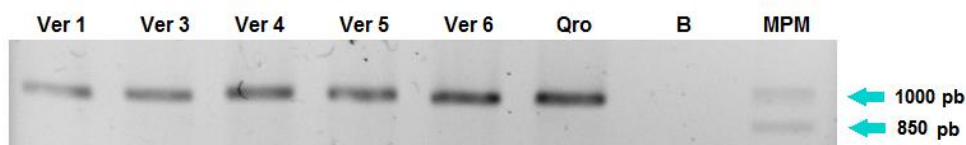


Figura 19. Fragmento del gen de la Subunidad menor del rDNA (*SSU*) de *T. cruzi*. Se realizó un PCR con los iniciadores 609F y 706R. Los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% colocando 10 μ L por pozo, de las muestras a secuencias y del control TcI (Qro). Blanco (B) (mezcla de reacción y agua estéril), marcador de peso molecular (MPM).

Para obtener el árbol filogenético del gen *SSU*, problema se realizó un alineamiento global con 12 cepas de referencia de los diferentes DTU's además de un grupo externo (*T. dionisii*) con el programa MEGA 7 encontrando el modelo de sustitución adecuado, Jukes-Cantor (JK), con el BIC más bajo (1513.098), por el método de Máxima verosimilitud. El árbol resultante con 4 clados, donde el primero abarca las cepas TcI con un valor de soporte de 79%, con las cepas V4 y V5. Un segundo clado bien definido es representado por las cepas TcIV con un valor de bootstrap de 86%. En un tercer clado se encuentra el grupo formado por las cepas de los DTU's TcII y TcV, y por último se encuentra el clado donde se agrupan las cepas con el genotipo TcII y TcVI, como se observa en la figura, en este clado se encuentran agrupadas las cepas problema V1, V3 y V6 (Fig. 20).

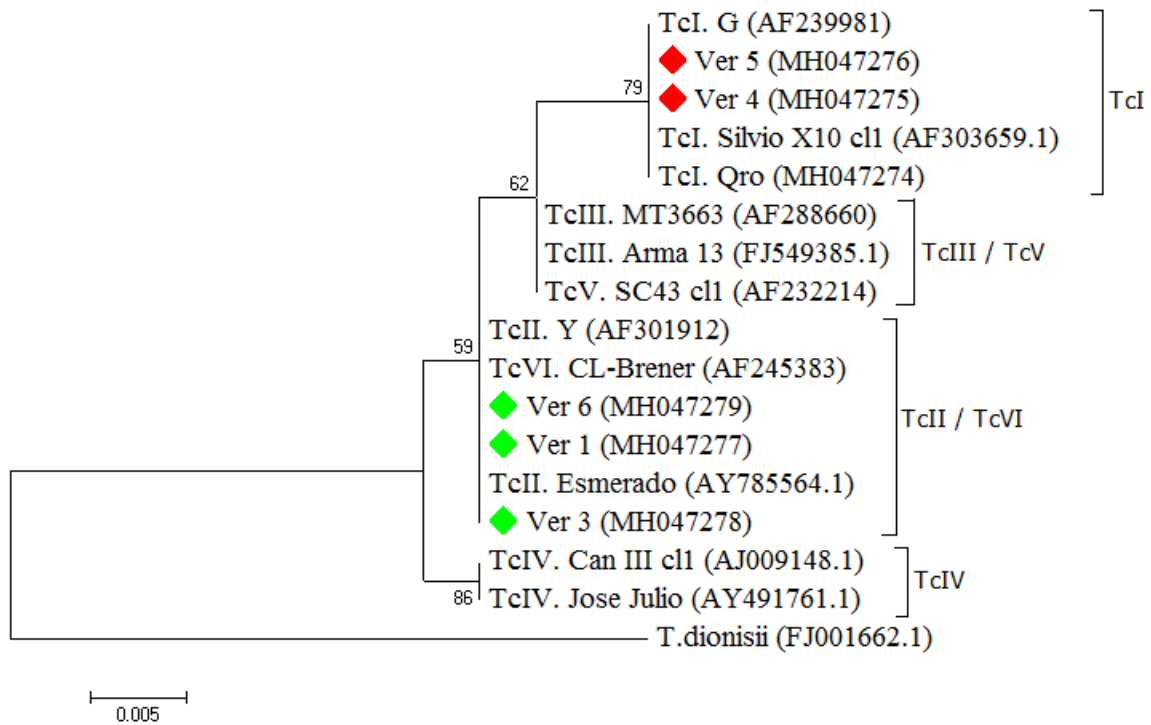


Figura 20. Árbol filogenético inferido por Máxima verosimilitud utilizando las secuencias del gen *SSU* del rDNA, realizado con 16 secuencias de aislados de *T. cruzi* y *T. dionisii*. El modelo de sustitución utilizado fue Jukes-Cantor, la topología observada fue resultado del alineamiento de 847 pb y los valores de bootstrap son derivados de 10 000 réplicas. Las cepas V1, V3 y V6 (diamante morado) se agruparon en el clado TcII-TcVI. Las cepas TcI (V4 y V5) siguen agrupándose en la rama para este DTU.

Tabla 6. CEPAS DE *T. CRUZI* UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS FILOGENETICO CON GENES DE *CYTB* Y *SSU*

DTU	Cepa	Origen biológico	Origen geográfico	Citocromo B N° acceso	SSU N° acceso
TcI	Silvio X1o cl1	<i>H. sapiens</i>	Brasil	AJ130928.2	AF303659.1
	G	<i>D. marsupialis</i>	Brasil	FJ156759.1	AF239981.1
	Tehuentepec cl2	<i>Triatoma sp.</i>	México	AJ130938.2	
	A04.F	<i>M. spinolai</i>	Chile	EU559323.1	
	862039	<i>D. marsupialis</i>	Bolivia	JF267940	
	Querétaro	<i>T. barberi</i>	México	MH047268	MH047274
	Ver 4	<i>D. marsupialis</i>	México	MH047269	MH047275
	Ver 5	<i>P. opossum</i>	México	MH047270	MH047276
TcII	Y	<i>H. sapiens</i>	Brasil	FJ168768.1	AF301912.1
	Esmerado cl3	<i>H. sapiens</i>	Brasil	AJ130931.2	AY785564.1
	Vtv	<i>T. infestans</i>	Chile	JF267932	
	CBB	<i>H. sapiens</i>	Chile	AJ439722.1	
TcIII	Arma 13 cl1	<i>D. novemcintus</i>	Paraguay	FJ549401.1	FJ549385.1
	MT3663	<i>P. geniculatus</i>	Brasil	EU856375.1	AF288660.1
	M6241 cl6	<i>H. sapiens</i>	Brasil	AJ130933.2	
	MS2682	<i>M. brevicaudata</i>	Brasil	EU856374	
TcIV	Can III cl1	<i>H. sapiens</i>	Brasil	AJ130929.2	AJ009148.1
	Jose Julio	<i>H. sapiens</i>	Brasil	EU856368.1	AY491761.1
	STc33R	<i>P. lotor</i>	USA	AJ439727.1	
TcV	9280 cl1	<i>H. sapiens</i>	Bolivia	AJ439725.1	
	SC43 cl1	<i>T. infestans</i>	Bolivia	AJ439721.1	AF232214.1
	MN cl2	<i>H. sapiens</i>	Chile	EU559325.1	
TcVI	CL-Brener	<i>T. infestans</i>	Brasil	AJ130935.2	AF245383
	Tulahuen cl2	<i>H. sapiens</i>	Chile	AJ130936.2	
	Guateque	<i>R. prolixus</i>	Colombia	AJ439724.1	
	X57	<i>C. familiaris</i>	Paraguay	AJ439723.1	
	Ver 1	<i>D. virginiana</i>	México	MH047271	MH047277
	Ver 3	<i>P. opossum</i>	México	MH047272	MH047278
	Ver 6	<i>D. virginiana</i>	México	MH047273	MH047279
<i>Marinkellei</i>	M1117	<i>P. hastatus</i>	Brasil	AJ130927.2	
<i>Leishmania</i>				AB095961.1	
<i>T. dionisii</i>	TCC/USP:1110	<i>T. persoicillata</i>	Brasil		FJ001662.1

7.2 Caracterización biológica

Diversos parámetros biológicos fueron evaluados en las cepas pertenecientes al estado de Veracruz para observar si además de presentar una genética diferente estas cepas también presentan un comportamiento biológico diferencial ya sea entre cepas o entre DTU's.

7.2.1 Evaluación de la cinética de crecimiento en medio LIT

El crecimiento de las cepas del estado de Veracruz se evaluó mediante una cinética de crecimiento en el medio LIT, la figura 21 es resultado de tres experimentos realizados independientemente donde se puede observar que la fase exponencial de crecimiento comienza a partir del día dos en todas las cepas, alcanzando su pico máximo de crecimiento en diferentes días. La cepa V6 alcanza su pico máximo de crecimiento al día 8 con 116.6×10^6 p/mL. Las siguientes cepas en alcanzar su máximo de parásitos fueron V3 y V4 al día 10 de cultivo (128.3×10^6 p/mL, 100.2×10^6 p/mL, respectivamente). Finalmente, las cepas V1, V5 y Qro llegaron al pico máximo de parásitos al día 12 con 98.33×10^6 p/mL, 99×10^6 p/mL, 100.56×10^6 p/mL, respectivamente. A partir del pico máximo de parásitos en cultivo, se observó en el caso de V3, V6 y V4, una fase estacionaria, para después entrar en una fase de muerte que es más notoria al día 14 en todas las cepas analizadas. Es importante mencionar que aunque existe un pequeño desplazamiento en la curva de crecimiento en las cepas V3 y V6 estas diferencias no representan un resultado significativo al compararse con las demás cepas evaluadas (Fig. 21).

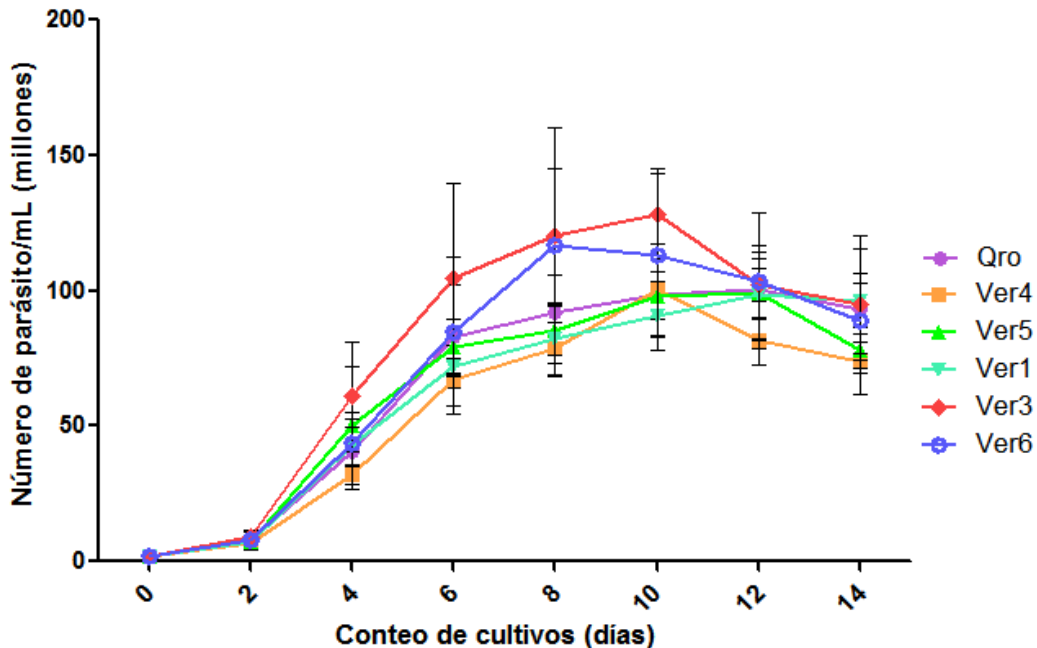


Figura 21. Cinética de crecimiento de las cepas del estado de Veracruz en medio LIT. Se realizó una cinética contando los parásitos cada dos días en un total de tres experimentos independientes. Los puntos por curva muestran los resultados promedio de las evaluaciones con su desviación estándar. Como estadístico se realizó un ANOVA de una vía para ver si existían diferencias en el crecimiento de las cepas pero estas no fueron significativas ($p < 0.05$).

7.2.2 Porcentaje de metaciclologénesis

Los porcentajes de transformación de los parásitos de epimastigotes a TM se obtuvieron cultivándolos por 11 y 14 días en medio de crecimiento LIT, en la literatura se ha asignado a este fenómeno el nombre de metaciclologénesis espontánea. La evaluación al día 11 en la cepa Qro y V3 tuvo como resultado su mayor porcentaje de transformación con 31.43% y 41,57% respectivamente, seguidos por la cepa V6 con 27.35%, V1 con 21.81% y por último las cepas V4 y V5 con menor porcentaje de metaciclologénesis (6.36% y 2.5% respectivamente). La evaluación del día 14 mostró resultados diferentes en la mayoría de las cepas, con mayores porcentajes de metaciclologénesis, la cepa que más se transformó fue V6 con 36.87%, V1 con 35.72%, V3 con 33.14%. Qro obtuvo un porcentaje muy similar en ambos días, con 31.01% a los 14 días de cultivo, y finalmente las cepas que menos se transformaron fueron nuevamente V4 con 7.51% y V5 con 5.52%. Se realizó un estadístico para probar si las diferencias observadas son significativas con un ANOVA de una vía y la prueba post hoc Tukey, encontrando que existen diferencias entre la cepa V3 que se transformó significativamente más en el día 11 de cultivo en contraste con las cepas V4 y V5; con esta última también hubo diferencia significativa al día 14 de cultivo (Fig. 22).

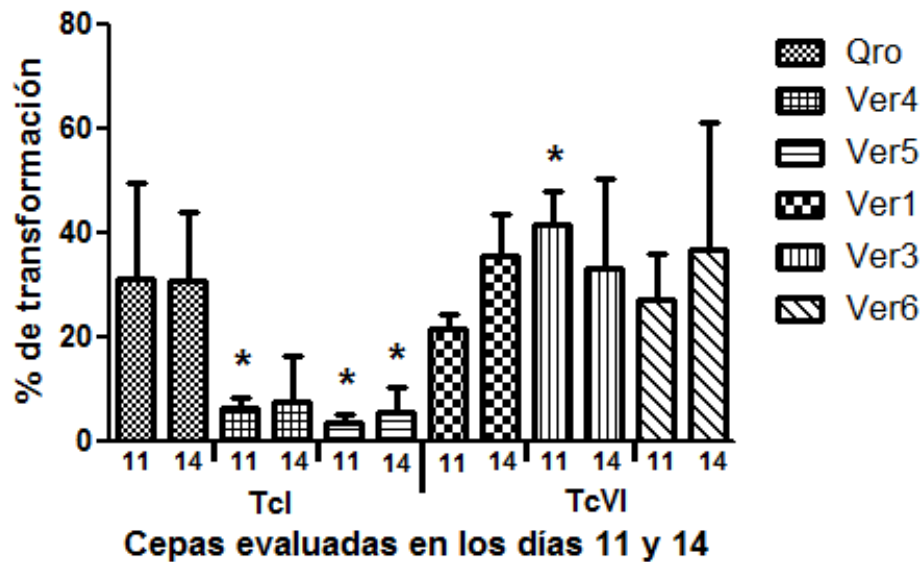


Figura 22. Capacidad de metacicloogénesis espontánea de las cepas del estado de Veracruz. Se evaluó la transformación espontánea de epimastigotes a TM en medio LIT al día 11 y 14 de cultivo por medio del ensayo de resistencia al complemento. La evaluación se realizó por triplicado graficando la desviación estándar, comparando el crecimiento de los parásitos entre días de cultivo y entre cepas por medio de la prueba ANOVA, las diferencias se marcan con asterisco (*) ($p < 0.05$).

Se sabe que existen medios de cultivo que promueven una metacicloogénesis más eficiente en *T. cruzi*, por lo que las cepas se evaluaron también cultivándolas en medio GRACE para comparar cuál medio es mejor induciendo este proceso. La cepa que más se transformó en este medio fue V6 con 71.39%, siendo mayor que el porcentaje de transformación de la cepa Qro que mostró un 67.39%, después siguió V1 con 60.17%, V3 con 53.11%, V5 con 41.67% y nuevamente la que mostró menor porcentaje de transformación fue V4 con 29.94% (Fig. 23). Realizando el estadístico de ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey, encontrando diferencias significativas en el porcentaje de transformación de las cepa V6 con respecto a V4 ($p < 0.05$).

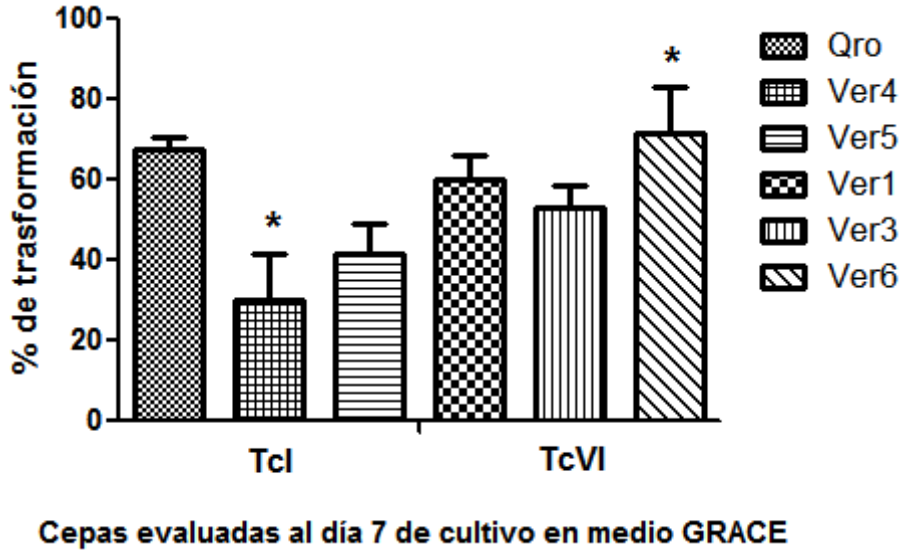


Figura 23. Capacidad metaciclogénica de las cepas del estado de Veracruz en medio GRACE. El porcentaje de transformación de epimastigotes a TM se evaluó en medio GRACE después de 7 días de cultivo en este medio por medio del ensayo de resistencia al complemento con un total de tres ensayos independientes y su desviación estándar. Las diferencias significativas entre cepas V3, contra V4 y V5 se resaltan con asterisco, como resultado de la prueba ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

7.2.3 Cuantificación de infección *in vitro* en células Vero

Para finalizar con la caracterización de factores biológicos del parásito se cuantificó la capacidad infectividad *in vitro* de las cepas del estado de Veracruz en células epiteliales Vero. Los TM purificados se enfrentaron a las células durante 6 horas para posteriormente contar el total de células infectadas.

La infección se observó en al microscopio y se tomaron varias fotos de diferentes campos de las células Vero infectadas con cada cepa, como se observa en la figura 24, donde es notable la diferencia de la infección. En la figura 24A se observa la cepa control Qro que presentó el mayor porcentaje de infección y más número de amastigotes presentes (flecha), en la figura 24B se muestra la cepa Ver 4 que fue la cepa de Veracruz más infectiva con presencia de células con amastigotes en el interior, en la figura 24C se muestran las células infectadas con la cepa Ver 5 con una cantidad menor de amastigotes. Con respecto a las cepas TcVI en la figura 24.D se muestra la cepa Ver 1 infectando en menor proporción las células Vero, con pocos amastigotes, en la figura 24E se muestra la cepa Ver 3 con infección más clara, y finalmente en la figura 24F se encuentra la cepa Ver 6, igualmente con presencia de células infectadas con amastigotes claros dentro de ellas, como ya se mencionó esta fue la cepa con mayor porcentaje de infección de las evaluadas del estado de Veracruz.

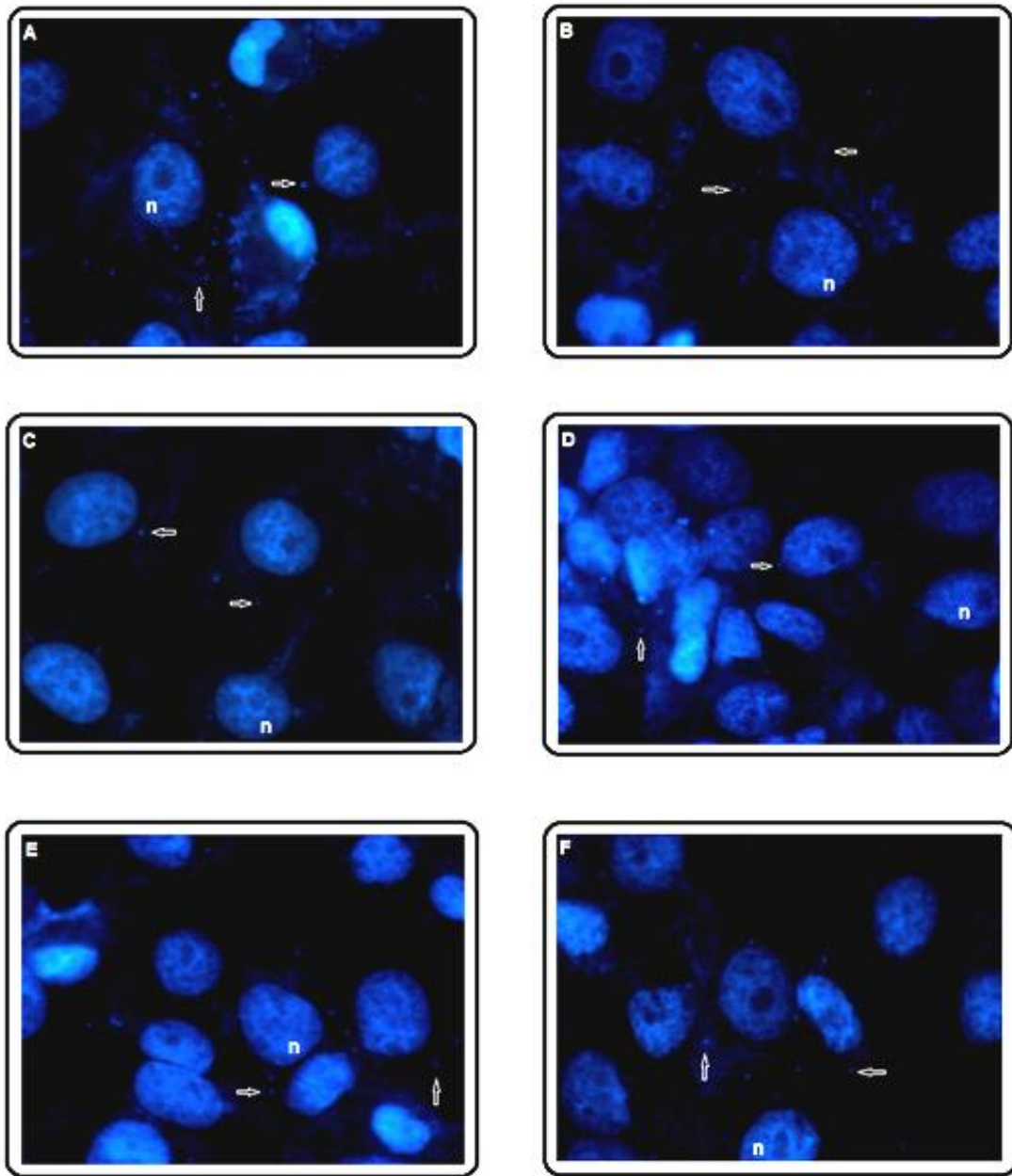


Figura 24. Infección de células Vero con cepas las cepas del estado de Veracruz de *T. cruzi*. Las células fueron infectadas con TM (1:15) por 6 horas, fijadas con metanol, teñidas con DAPI, analizadas en el microscopio invertido y fotografiadas. En la figura se muestran imágenes representativas de la infección con las cepas evaluadas, la cual se realizó por triplicado en tres ensayos independientes. A) cepa control TcI, Qro; B) cepa TcI, Ver 4; C) cepa TcI, Ver 5; D) cepa TcVI, Ver 1; E) cepa TcVI, Ver3; F) TcVI, cepa Ver6. Las flechas blancas señalan los amastigotes intracelulares, (n) núcleo de la célula Vero 40X.

Al cuantificar la capacidad de infección *in vitro* en células Vero, la cepa que presentó el porcentaje más alto fue la cepa control Qro con un 44.74%, las cepas del estado de Veracruz presentaron una heterogeneidad en su infección *in vitro* siendo V6 la cepa que infectó más con un 35.67% de infección, seguida por V4 con un 31.89%, la cepa V5 infectó un 28.55%, mientras que V3 infectó 26.91%, la cepa que infectó menos fue V1 con un 19.94%. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (ANOVA de una vía $p>0.05$) (Fig. 25).

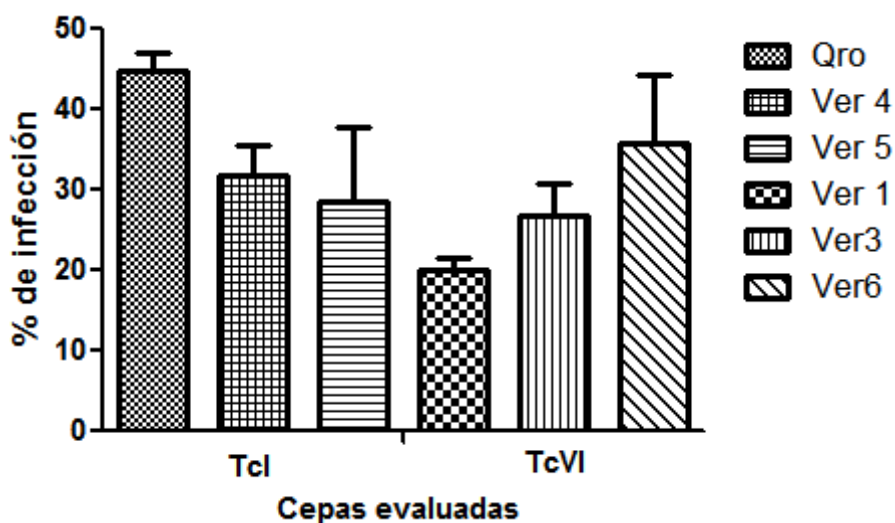


Figura 25. Infección *in vitro* en células Vero por las cepas de *T. cruzi* del estado de Veracruz. Se cuantifico la capacidad infectiva de los TM obtenidos de medio GRACE. Los parásitos se incubaron durante 6 horas con células Vero (1:15), se lavaron, fijaron y tiñeron para su observación y conteo. Por cepa se realizó un conteo mínimo de 150 células por triplicado en ensayos independientes, mostrando el promedio y la desviación estándar de los tres experimentos. Se realizó un ANOVA de una vía sin encontrar diferencias significativas en la infección ($p<0.05$).

7.3 Perfil proteico y caracterización antigénica

Para observar si dicha infección *in vitro* resultaba diferencial entre las cepas evaluadas del estado de Veracruz por proteínas expresadas, se decidió observar el perfil proteico, realizando un extracto total de proteínas de epimastigotes y se comparó entre cepas teniendo como controles la cepa Qro y Ninoa.

En el perfil de proteínas se puede observar que entre todas las cepas evaluadas se comparten bandas de proteínas, donde se observaron entre 12 y 14 bandas

predominantes. Las bandas de proteínas con mayor peso se encuentran entre los 100 y 90 kilodaltons (kDa) con un doblete que es más evidente en las cepas pertenecientes al TcVI y menos notorio en nuestros controles Qro y Ninoa; a la altura de 70 kDa la banda de proteínas observada es más intensa en las cepas TcVI, seguida por la banda de proteínas más abundante en este perfil alrededor de los 50 kDa, a los 45 kDa se aprecia una pequeña banda más notoria en los TcVI y a continuación un doblete a la altura de 37-40 kDa que sólo se presenta en las cepas provenientes de reservorios y no en nuestros controles, donde solo se ve la banda de 40 más notoriamente. La concentración de proteínas usada (10µg) da como resultado geles que pueden ser comparables utilizados como control de carga en los experimentos posteriores de Western Blot (Fig. 26).

Algunas bandas de proteínas se observaron distintas entre ambos DTU's, la más notoria fue la que se observó en los 14 kDa y sólo está presente en las cepas TcVI, con un triplete que se ha encontrado como característico en estas cepas del estado de Veracruz TcVI. En cambio las cepas TcI, incluyendo los controles, sólo muestran un doblete a la misma altura. Otra banda de proteínas que llama la atención y sólo se aprecia en los controles Qro y Ninoa, es la banda menor a los 10 kDa, que no es apreciable en las cepas del estado de Veracruz (Fig. 26).

Continuando con los análisis de las proteínas se investigó cuales de éstas podían ser reconocidas por sueros de animales expuestos al patógenos, por lo que se decidió realizar Western Blots (WB) para identificar las proteínas antigénicas encontradas en cada cepa al ser expuestas ante el mismo suero con anticuerpos anti-*T. cruzi*.

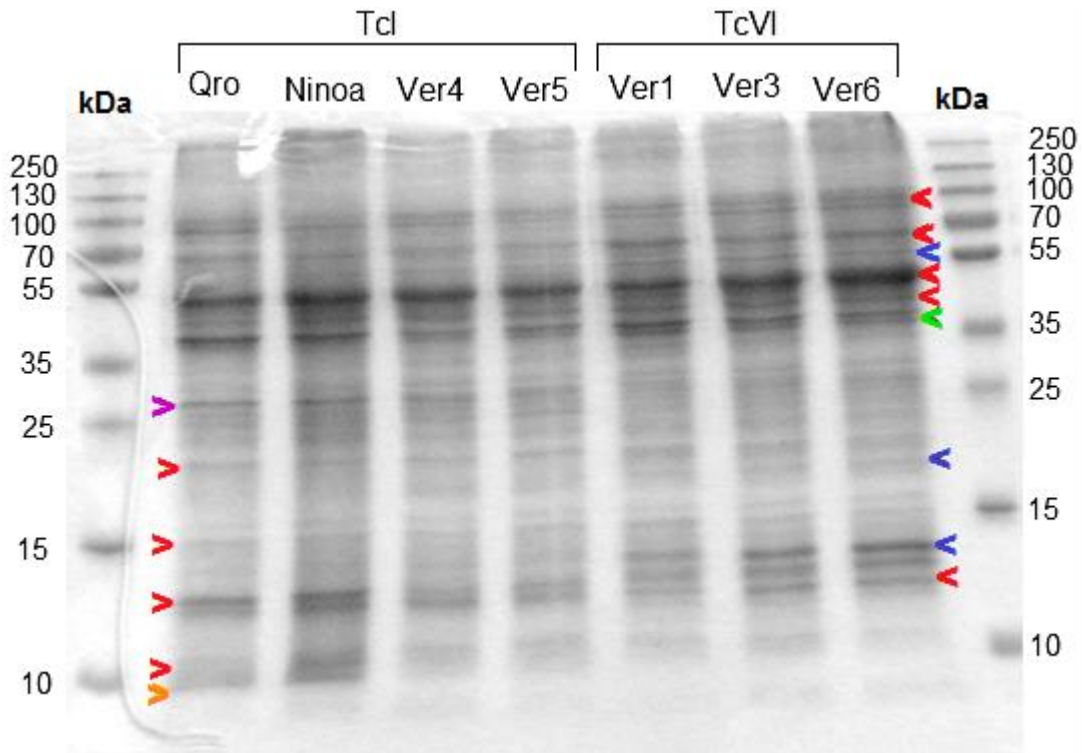


Figura 26. Perfil de proteínas de las cepas del estado de Veracruz y de Qro y Ninoa. Las proteínas fueron obtenidas por sonicación, por pozo se colocaron de 10 µg de cada extracto total de proteínas por cepa, en un gel de poliacrilamida al 12%. Las flechas señalan las proteínas. Flecha roja: proteínas compartidas entre todos los grupos analizados; flecha azul: proteínas encontradas en las cepas TcVI; flecha verde: proteínas encontradas sólo en las cepas del estado de Veracruz; flecha morada: proteínas encontradas sólo en las cepas TcI; flecha naranja: proteínas encontradas en los controles Qro y Ninoa. Gel de proteínas representativo. En los extremos del gel se muestran los marcadores de peso molecular.

Se evaluó el reconocimiento de proteínas antigénicas con un suero de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Qro, en una dilución 1:25, contra todas las cepas del estado de Veracruz además de Qro y Ninoa. Con este suero anti-*T. cruzi* se encontraron varias diferencias en el reconocimiento de proteínas antigénicas, una banda de 250 kDa fue reconocida solamente por los anticuerpos en las cepas TcVI y una de 190 por las TcI, al igual que una banda antigénica 54 y 34 kDa. Cerca de los 16 kDa se reconoció una proteína antigénica solo en las cepas del estado de Veracruz y seis bandas de proteínas antigénicas mayoritarias fueron reconocidas en todos los grupos evaluados con este suero (57, 45, 25, 18, 14 y 13 kDa) (Fig. 27).

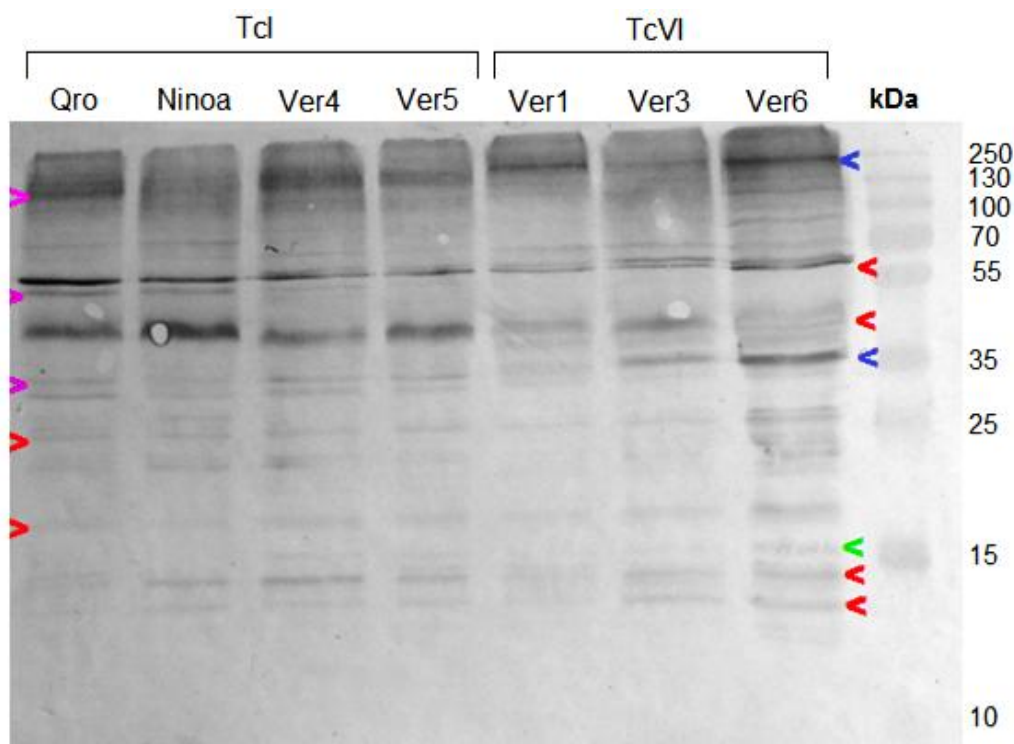


Figura 27. Antígenos reconocidos por el suero anti tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Qro en las cepas del estado de Veracruz. Los geles de proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó O/N y se incubó con un suero anti-*T. cruzi* cepa Qro por 2 h. Se muestra un WB representativo donde se resaltan las proteínas antigénicas. Flecha roja: antígenos compartidos entre todos los grupos analizados; Flecha azul: antígenos encontrados en las cepas TcVI; Flecha verde: antígenos encontrados sólo en las cepas del estado de Veracruz; Flecha morada: antígenos encontrados sólo en las cepas TcI.

Continuando con la evaluación de las cepas con sueros anti-*T. cruzi*, una membrana sensibilizada con las cepas como antígenos se puso en contacto contra un suero de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Ninoa y posteriormente se observó el reconocimiento de las proteínas antigénicas (Fig. 28). Un total de 13 proteínas antigénicas fueron analizadas, en donde tres de ellas solamente se encontraron en las cepas pertenecientes al DTU TcVI con un peso de 250, 44 y 25 kDa. A la altura de los 65 kDa se observa la presencia de una banda de proteínas antigénica mayoritaria presente en todas las cepas, mientras que a cerca de los 50 kDa se encontró una proteína antigénica reconocida solamente por las cepas veracruzanas, a la altura de 70 kDa se observó una banda definida de antígenos reconocida sólo por TcI. Las bandas antigénicas que llaman la atención es el triplete encontrado en 14, 13 y 12 kDa, que se observa en todas las cepas evaluadas, proteínas que no se observaron claramente en el perfil proteico de las cepas TcI.

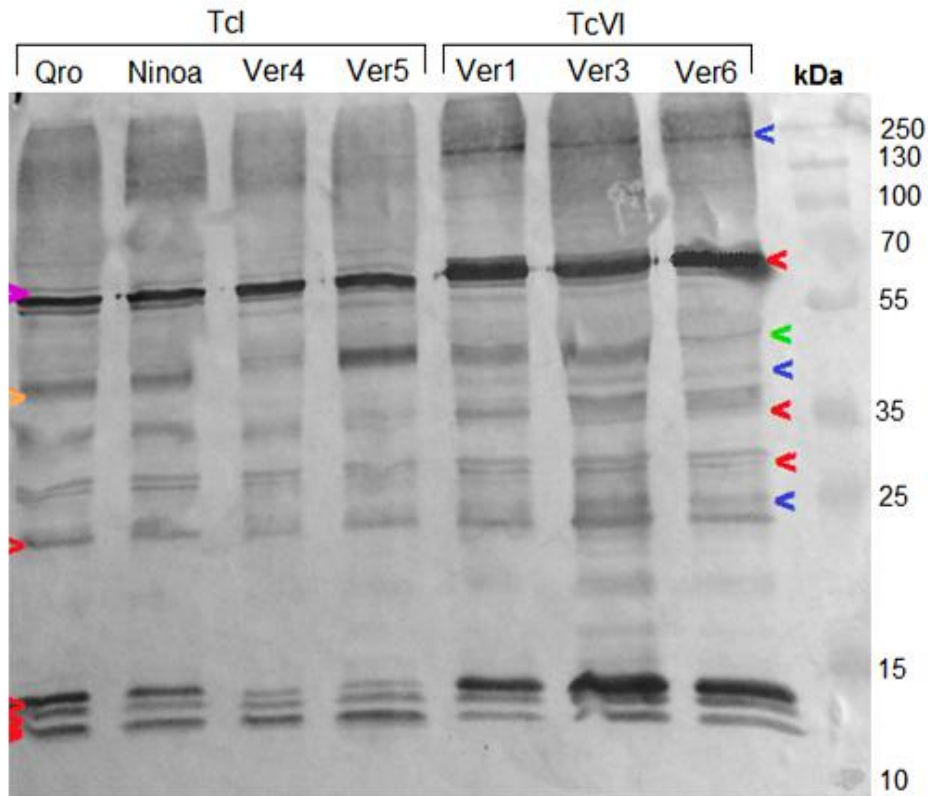


Figura 28. Antígenos reconocidos por el suero anti tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Ninoa en las de cepas del estado de Veracruz. Los geles con proteínas Las proteínas en gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó toda la noche y se incubó con un suero anti-*T. cruzi* cepa Ninoa por 2 h. Se muestra un WB representativo donde con la flechas se remarcan las principales proteínas antigénicas evaluadas con este suero. Flecha roja: antígenos compartidos entre todos los grupos analizados; Flecha azul: antígenos encontrados en las cepas TcVI; Flecha verde: antígenos encontrados sólo en las cepas del estado de Veracruz; Flecha morada: antígenos encontrados sólo en las cepas TcI; Flecha naranja: antígenos encontrados en los controles Qro y Ninoa.

Otro suero importante para evaluar fue el suero CHAT, control formado por un pool de sueros humanos con anticuerpos anti-*T. cruzi* para hacer diagnóstico de la enfermedad de Chagas que se obtiene de forma comercial, este suero se probó nuevamente contra una membrana con los antígenos de las cepas del estado de Veracruz y con las cepas controles (Fig. 29). El reconocimiento principal se observa en 12 bandas de proteínas antigénicas de las cuales se encontraron en todas las cepas evaluadas en los pesos de 70, 64, 33, 30, 25 y 23 kDa. En cuanto a las cepas TcVI, bandas de antígenos únicas se encontraron en 37, 21 y 14 kDa. Una banda de proteínas antigénicas para todas las cepas de Veracruz fue observada a los 35 kDa, mientras que para las TcI se encontró una banda general a los 130 kDa, al igual que para las cepas TcI del estado de Veracruz se encontró una banda de 24 kDa.

En este caso se encontró una división más clara entre los DTU's tanto por su genotipo como por su origen biológico ya que en el caso de las TcI se observó una banda extra en las cepas aisladas de reservorios didélfidos (35 kDa).

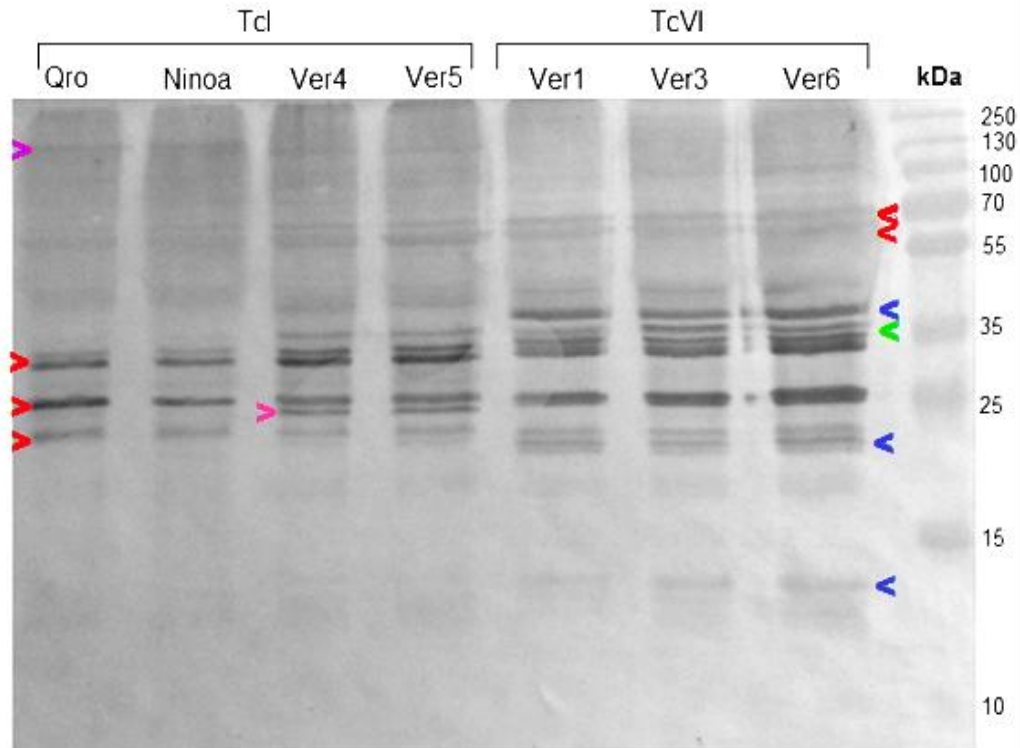


Figura 29. Antígenos reconocidos por un pool de sueros humanos anti-*T. cruzi* en las cepas del estado de Veracruz. El gel de proteínas se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó toda la noche se incubó con el pool de sueros humanos anti-*T. cruzi* por 2 h. Este es un WB representativo donde con las flechas se resaltan las principales proteínas antigénicas utilizadas para este análisis. Flecha roja: antígenos compartidos entre todos los grupos analizados; Flecha azul: antígenos encontrados en las cepas TcVI; Flecha verde: antígenos encontrados sólo en las cepas del estado de Veracruz; Flecha morada: antígenos encontrados sólo en las cepas TcI; Flecha rosa: antígenos encontrados en las cepas TcI del estado de Veracruz.

Finalmente se probó un suero anti-*T. cruzi* de conejo inmunizado para evaluar el reconocimiento de las proteínas antigénicas encontradas en las cepas del estado de Veracruz (Fig. 30). Con un total de 12 bandas de proteínas antigénicas reconocidas donde dos de ellas fueron únicamente reconocidas en el grupo TcVI en los pesos de 115 y 14 kDa, esta última siendo del triplete característico de dicho DTU. Una banda se observó a la altura de 200 kDa únicamente para las cepas V4 y V5, mientras que las bandas restantes fueron reconocidas en todas las cepas analizadas con este suero, en los pesos de 125, 100 y 90 kDa, un antígeno mayoritario de 70 kDa seguida por antígenos de 50, 47, 44, 13 y 10 kDa.

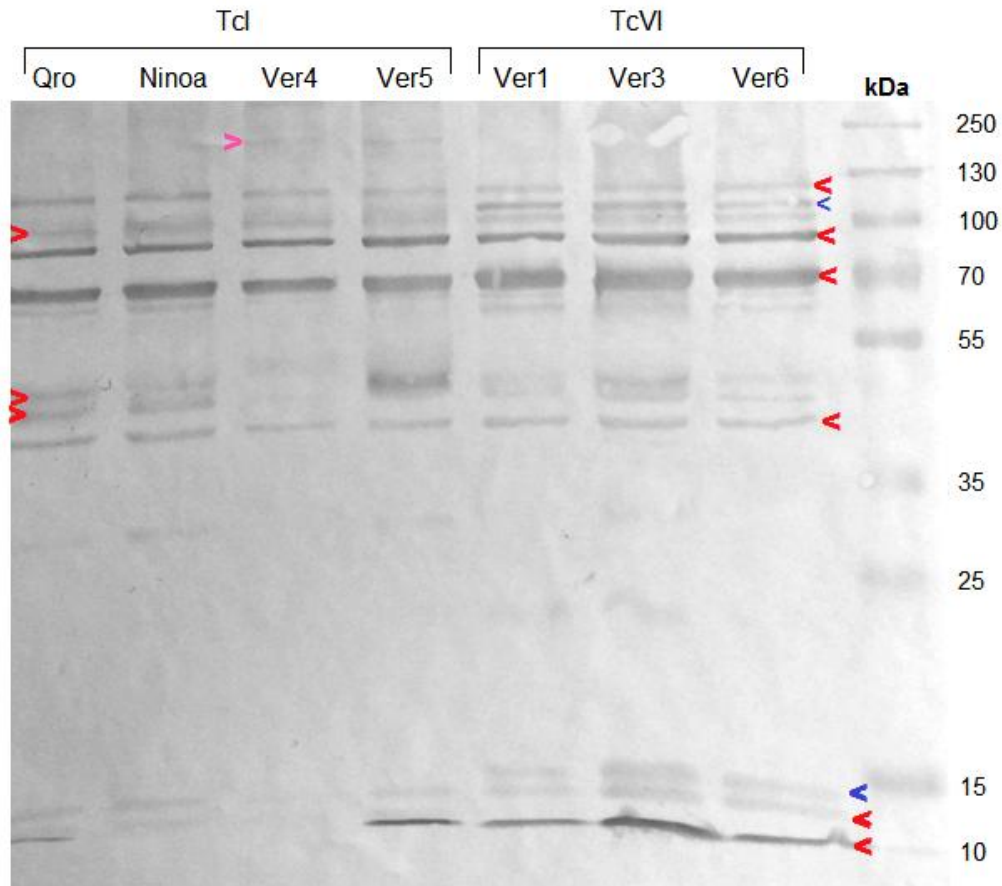


Figura 30. Antígenos reconocidos por el suero anti- *T. cruzi* de conejo con las cepas del estado de Veracruz. El gel de proteínas se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó O/N y se incubó con un suero anti-*T. cruzi* conejo por 2 h. Se observa un WB representativo donde se resaltadas con las flechas las principales proteínas reconocidas que fueron utilizadas para este análisis. Flecha roja: antígenos compartidos entre todos los grupos analizados; Flecha azul: antígenos encontrados en las cepas TcVI; Flecha rosa: antígenos encontrados en las cepas TcI del estado de Veracruz.

Dentro de las proteínas antigénicas evaluadas se analizaron las compartidas entre todos los sueros anti-*T. cruzi*, los único antígeno constante en los cuatro sueros utilizados fueron una banda de 70~ kDa y otra de 14 kDa, esta última se encuentra dentro del triplete constante en el TcVI.

8. DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi, el protozooario parásito causante de la enfermedad de Chagas presenta una amplia diversidad genética que ha sido definida por diversos marcadores, existiendo varios esquemas que se proponen para la tipificación, desde los análisis de tipo RADP's, MLEE o ensayos de RFLP's con polimorfismos de varios *loci*. Cualquiera que sea el caso, la tipificación de este organismo representa un reto por la diversidad de resultados encontrados (Zingales *et al.*, 2012). Varios autores aseguran que siguiendo el esquema de tipificación realizado en este trabajo, las cepas quedarán asignadas a un DTU, lo cierto es que muchos otros autores han encontrado discordancias en los amplificadores para los marcadores como 24S α o el caso del 18S del rDNA, en el cual el amplificado de 165 pb que definiría al TcII también se encuentra en algunas cepas TcVI como se vio en este trabajo (Brisse *et al.*, 2001; Ibáñez *et al.*, 2013; Marcet *et al.*, 2005).

Se sabe que existen características inherentes a la cepa que producen diversos amplificadores, debido a ello, ahora hay autores que proponen la secuenciación de al menos dos genes, uno nuclear y otro mitocondrial, para tener una genotipificación más certera, es por eso que en este trabajo se decidió determinar del linaje genético bajo este criterio de secuenciación. Se obtuvo como resultado final la correcta asignación de las cepas a tipificar observado las mismas topologías reportadas tanto para *CytB* con tres clados como para la secuencia *SSU* (Brisse *et al.*, 2003; Marcili *et al.*, 2009).

Los resultados genéticos mostraron que dos de nuestras cepas (Ver4 y Ver5) corresponden al DTU TcI, el genotipo más ampliamente reportado en nuestro país (Bosseno *et al.*, 2001), además de que la asociación de dicho DTU con los reservorios didélfidos también coincide con reportes anteriores (Izeta-Alberdi *et al.*, 2016; Zingales *et al.*, 2012). Mientras que el DTU TcVI ha sido ampliamente encontrado en Sudamérica sin una asociación clara con los didélfidos (Izeta-Alberdi *et al.*, 2016), en el caso de México, este genotipo ha sido reportado únicamente en el estado de Michoacán afectando humanos (Lopez-Cancino *et al.*, 2015), así que nuestros resultados son los primeros en encontrar esta asociación TcVI-didélfidos en el país.

Siendo Veracruz el primer estado en presentar toda la diversidad de DTU's en la República Mexicana surge la pregunta, ¿Por qué ésta diversidad no se refleja en los reportes de humanos infectados, donde sólo se ha encontrado el TcI? Una de las posibles respuestas se relaciona con diversos estudios que se han realizado, donde con dos cepas infectan un mismo ratón, cuando se hace un análisis final de la cepa sólo se encuentra uno de los dos aislados; esto ha sido abordado por algunos autores que aseguran que el sistema inmune del hospedero es el que hace una selección dentro de la población del parásito, algo que

podría estar sucediendo en México, porque a pesar de encontrar amplia diversidad de DTU's en reservorios y vectores, predomina el TcIen caso humanos, sugiriendo que la misma genética de la población mexicana es la que hace ese embudo para algunos DTU's (WHO, 2002).

Otra posible respuesta se encuentra en la falta de reportes de tipificación, este es un problema que se presentó al momento de hacer el mapa de "Distribución de DTU's en México", pues pese a encontrar muchos reportes de seroprevalencia en el norte, centro y sur del país, muchos de estos no realizan un trabajo para saber el fondo genético de las cepas infectantes, limitando la información, lo que impide tener un panorama más amplio sobre la enfermedad de Chagas en México.

En cuanto a los parámetros biológicos, sabemos que las cepas de *T. cruzi* son muy diversas y causan diferentes manifestaciones clínicas, sin embargo, actualmente no existe información concreta de alguna asociación entre el linaje al que pertenecen las cepas y el comportamiento biológico o las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes. Se han tratado de realizar asociaciones del DTU con cierta manifestación clínica como es el caso de TcI con la miocardiopatía chagásica, pero está claro que dicha patología también se reporta en pacientes infectados con las cepas TcII, TcV y TcVI, lo mismo sucede con los megasíndromes que se adjudican a cepas TcII pero también se presentan con el TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2012).

En la cinética de crecimiento en el medio LIT de las cinco cepas del estado de Veracruz no se encontraron diferencias significativas, algunos otros estudios de caracterización han realizado este ensayo probando diferentes medios como GRACE o TAU, donde se pueden observar variaciones entre la misma cepa de acuerdo a las características propias. Si bien el medio LIT se considera uno de los mejores para el crecimiento del parásito, no debemos dejar a un lado la idea de que cada cepa es diferente y tiene requerimientos específicos (López-Olmos *et al.*, 1998; Rodríguez-González *et al.*, 2004). En un estudio se utilizó el medio GRACE complementado para el crecimiento de los parásitos, en este caso cepas sudamericanas presentaron picos de parásitos de hasta 1.8×10^7 p/mL, muy por debajo de lo observado con las cepas veracruzanas, lo que indica que el enriquecimiento del medio es esencial para la replicación de las cepas (Rodríguez-González *et al.*, 2004). Otros reportes de cinética de crecimiento en cepas brasileñas señalan que las cepas del linaje TcVI pueden alcanzar a su máximo de parásitos al día 8 de cultivo, cosa que se observó solamente con V6, mientras que las TcI brasileñas presentaron un retardo en su crecimiento (10-13 días), al igual que las cepas evaluadas en este trabajo (Oliveira *et al.*, 2017).

Dentro de la transformación de epimastigotes a TM los dos procedimientos evaluados en este trabajo (metacicloogénesis espontánea y en medio GRACE), presentaron diferencias en los porcentajes finales de transformación, ya que el medio es indispensable para observar una tasa mayor de metacicloogénesis así como también las condiciones de estrés nutricional, osmótico y de espacio favorecen este proceso, cosa que ya ha sido reportada anteriormente en diversos estudios. En evaluaciones de metacicloogénesis espontánea en cepas panameñas se muestran valores del 50-25% de transformación al día 11 de cultivo, fenómeno que se replica con las cepas TcVI que aquí se evaluaron, mientras que las cepas TcI quedan muy por debajo de este valor lo que podría sugerir que son cepas con mayor resistencia al estrés y que requieren más tiempo para comenzar su proceso de transformación espontánea (Seco-Hidalgo *et al.*, 2015).

En nuestro laboratorio en 1998, se probaron los medios LIT, GRACE y TAU para inducir la metacicloogénesis de cepas mexicanas y sudamericanas, dejando ver que el medio GRACE en todas las cepas analizadas produjo el doble de transformación que los otros medios (López-Olmos *et al.*, 1998). En los experimentos realizados para esta tesis se comprueba que el medio GRACE induce valores más altos de transformación, a diferencia de los transformados de forma espontánea en medio LIT, aunque es importante mencionar que existen reportes de que las cepas de *T. cruzi* mantenidas por largo tiempo en cultivo, como es el caso de las cepas veracruzanas, reducen su capacidad de producir metacicloogénesis espontánea, lo que explicaría porque las cepas analizadas bajo este proceso obtuvieron valores de transformación más bajos (Contreras *et al.*, 2006). Para transformar a los parásitos se requiere utilizar un medio que recree las condiciones de estrés naturales del parásito en el tracto intestinal del vector, para producir TM, ya que este parámetro es fundamental, algunos autores lo relacionan con la virulencia de las cepas y su mantenimiento en la naturaleza (Seco-Hidalgo *et al.*, 2015).

Otro parámetro biológico importante es la evaluación de la capacidad infectiva *in vitro*, como ya se mencionó, se sabe que las cepas que llevan muchos años congeladas o están cultivadas en medios “selectivos” por años pierden su virulencia o capacitación para invadir células, por lo que se recomienda realizar pases continuos en ratones o insectos triatóminos para aumentar la capacidad infectiva. Si bien, las cepas del estado de Veracruz sí infectaron las células Vero después de 6 horas de co-incubación, la infección fue menor a la observada con la cepa Qro, ya probada en el laboratorio. Al comparar estos resultados con reportes previos en la literatura de cepas basileñas TcI, TcII y TcVI, donde el tiempo de incubación va de 24 hasta 78 horas, vemos que la infección de las cepas veracruzanas igualaron los resultados de estas cepas a las 24 horas de infección, con valores que van desde 20 hasta 50%, lo que habla de una capacidad infectiva mayor en nuestras cepas (Oliveira *et al.*, 2017).

En otro estudio se comparó la infección de TM de las cepas CL (TcVI) y G (Tcl) durante una hora en células HeLa, un tiempo menor al que evaluamos en este trabajo, como resultados se vio una infección tres veces mayor de CL con un 27% contra el 9% de la cepa G, una diferencia tan marcada no se observó con nuestras cepas evaluadas, ya que entre V6 y V4 sólo variaron un 4% (no significativo). En ese trabajo se concluyó que las diferencias de infección celular de los parásitos no depende del DTU sino de la expresión de proteínas antigénicas presente en la superficie de los parásitos (Clemente *et al.*, 2016), aunque también, la capacidad infectiva va a depender del tipo celular al que se estén exponiendo los parásitos y del tropismo que estos tengan (López-Olmos *et al.*, 1998). En algunos trabajos se reporta que las cepas Tcl son más infectivas en células tipo cardiomiocitos y las TcII en células Vero (Oliveira *et al.*, 2017), en nuestro laboratorio la cepa Qro (Tcl) se encontró muy infectiva contra las células Vero, pudiendo acabar con un cultivo celular sano en menos de una semana.

Las evaluaciones realizadas en este trabajo demuestran la gran diversidad en los comportamientos biológicos sin relacionarse directamente a las cepas y los resultados son independientes a su origen biológico o DTU.

Finalmente, los perfiles proteicos y el reconocimiento de proteínas antigénicas en las cepas evaluadas, mostraron discordancias que podrían ser la explicación de las diferencias encontradas en los parámetros biológicos como transformación e infección *in vitro*, entre cepas y DTU's.

Proteínas como la gp82 y gp90 se han encontrado relacionadas con la metacicloénesis de las cepas; en un estudio realizado por Bayer-Santos y colaboradores, demostraron que los niveles de mRNA de estas proteínas, aumentaban en formas intermedias del parásito hasta llegar a su máxima expresión en el tripomastigote, esto cobra sentido ya que estas mismas proteínas también se han encontrado relacionadas con la capacidad infectiva. Se sabe que la gp82 promueve la invasión celular por medio de la movilización de Ca^{2+} intracelular, además de la ruptura de los filamentos de actina, mientras que la gp90 se ancla a las células del mamífero sin movilizar Ca^{2+} , por lo que se relaciona inversamente con la infectividad (Bayer-Santos *et al.*, 2013; Málaga y Yoshida, 2001). En el perfil proteico de las cepas veracruzanas se observa un doblete a la altura de 90 kDa, dichas proteínas podrían tratarse justamente de éstas gp's, las cuales se observan con mayor intensidad en las cepas TcVI, lo que podría relacionarse con el hecho que hay valores más altos de transformación en las cepas TcVI veracruzanas con relación a las Tcl y también con la baja infección de V1 y V3.

Es claro que las cepas de *T. cruzi* comparten una gran cantidad de proteínas, ya sea en la membrana o internas que son constitutivas, las cuales participan en funciones vitales de los parásitos, pero también existen variaciones entre sus perfiles proteicos que pueden derivar en sus diferencias de virulencia como ya se discutió anteriormente. Al haber una mayor expresión de proteínas nos hablaría de que podría existir un reconocimiento mayor de proteínas antigénicas por parte de anticuerpos o células que puedan causarle daño a los parásitos. Varias de estas proteínas resaltan por ser antígenos inmunodominantes reconocidos por sueros de mamíferos infectados con *T. cruzi*.

Al analizar los antígenos reconocidos por anticuerpos encontrados en los sueros de ratón, conejo y humano infectados, encontramos algunas proteínas antigénicas que podrían tratarse de las que han sido previamente reportadas.

En un estudio se evaluaron las proteínas antigénicas de alto peso molecular, >90 kDa. En pacientes infectados, tanto sintomáticos como asintomáticos, se ha reportado una banda de 250 kDa, nosotros al evaluar los sueros de ratones infectados con las cepas Qro y Ninoa observamos una banda a esa altura únicamente en las cepas TcVI, igualmente, en pacientes sintomáticos se ha reportado una banda específica de 225 kDa, lo que no se observó con ninguno de los sueros probados en este trabajo. En ese mismo artículo mencionan dos bandas predominantes en pacientes asintomáticos de 130 y 160 kDa, nosotros encontramos bandas de 130-125 kDa en las cepas evaluadas contra los sueros de humano y conejo (respectivamente), que podrían tratarse de ese antígeno, el cual al ser reconocido mayoritariamente por pacientes asintomáticos es mencionado como la posible causa del por qué no desarrollan síntomas (Cervantes-Landín *et al.*, 2014).

Otro antígeno que se ha encontrado como inmunodominante e importante es la proteína cruzipaína (51-57 kDa), en un estudio de proteómica realizado en dos cepas pertenecientes al zimodema 3 (TcIII y TcIV) con perfiles variables de infección en células Vero, se demostró que ésta se liga con la expresión de la cruzipaína la cual es esencial para la invasión celular (Kikuchi *et al.*, 2010). En los WB con los sueros de ratones infectados con las cepas Qro, Ninoa y suero de conejo inmunizado con la cepa Qro, encontramos tres antígenos dentro de esos rangos de peso (57 y 50 kDa) que podrían corresponder a la cruzipaína, cabe señalar que al utilizar el suero anti-Qro, esta banda de 57 kDa se ve menos intensa en las cepas V1 y V3, lo que podría relacionarse con sus porcentajes más bajos de infección, esto fue demostrado por San Francisco y colaboradores quienes al colocar tripomastigotes de cultivo frente a cardiomiocitos en presencia de anticuerpos anti-cruzipaína, observaron una reducción marcada en el porcentaje de infección de hasta un 70% (San Francisco *et al.*, 2016).

En pacientes con la enfermedad de Chagas, las proteínas en el rango de 30-34 kDa han sido frecuentemente reconocidas por los sueros de pacientes. En el WB contra el suero CHAT, la fracción entre 30-35 kDa mostró un número mayor de proteínas antigénicas, además de presentar reconocimientos diferentes entre cepas (Burns *et al.*, 1992; Verissimo *et al.*, 2012).

Un complejo de tres proteínas se ha reconocido utilizando sueros de animales infectados (24, 31 y 37 kDa), dentro de nuestra evaluación encontramos tres antígenos que corresponden a esos pesos en las cepas TcVI, con el pool de sueros de humanos (suero Chat) (Ferguson *et al.*, 1985). Éstas proteínas han sido reportadas en extractos de epimastigotes, al igual que la gp72, que es única de dicho estadio e igualmente se relaciona con el control de la diferenciación a tripomastigotes, nosotros encontramos el reconocimiento de una proteína constante con todos los sueros utilizados a la altura de 70~ kDa, que podría tratarse de esta glicoproteína, resaltando por su intensidad cuando se utilizó el suero anti-Ninoa y el suero de conejo inmunizado con la cepa Qro, o bien, ese antígeno reconocido podría tratarse de la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la cual es una de las proteínas más conservada y que desempeña funciones muy importantes en el parásito (Ürményi *et al.*, 2014).

Por último, se analizaron las proteínas de bajo peso molecular como la gp25, que ha sido propuesta por su importancia para el diagnóstico potencial de esta parasitosis. En este trabajo podría tratarse de la encontrada con tres de los sueros analizados, solamente no se reconoció cuando se usó el suero de conejo anti-Qro (Ferguson *et al.*, 1985). Algunas otras proteínas de bajo peso son las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP), como la sHSP16 y la HSP10, que funcionan como chaperonas asociadas a otra HSP, en diversos estudios se ha visto una mayor expresión de éstas al momento de que el parásito entra en estrés, con los sueros utilizados (suero de ratón y suero de conejo anti-Qro), se reconocieron dos proteínas en las cepas veracruzanas que podrían ser estas HSP (Ürményi *et al.*, 2014).

Con el uso de los diversos sueros encontramos una gama de reconocimiento de proteínas antigénicas diferentes que nos pueden servir para la identificación del parásito con el estadio epimastigote, el cual se ha usado ampliamente por su utilidad y facilidad al poder cultivarlo; como se puede observar, el reconocimiento de muchas proteínas con los sueros de diferentes orígenes biológicos, nos permitieron detectar antígenos que pueden funcionar para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que fueron constantes en los diversos DTU's (70~ y 14 kDa), y otras proteínas nos permitieron diferenciar a las cepas TcI (130 y 70 kDa) de las TcVI (250, 37 y 115 kDa). También hubo un reconocimiento

específico de proteínas antigénicas en las cepas provenientes de reservorios didélfidos (59, 35 y 16 kDa).

Sería importante realizar un análisis más profundo para identificar las proteínas antigénicas que están siendo identificadas, con el fin de definir las y revisar su expresión dentro de las diversas cepas.

La revisión de las características biológicas que presentan los aislados de nuevos linajes de *T. cruzi*, es necesaria para determinar el curso de la infección en el humano, los patrones biológicos y el comportamiento diferencial. Se tiene que prestar especial atención en las zonas endémicas, indagando en el cuadro clínico y tratando de asociarlo a los DTU's circulando en dicha área para ampliar el conocimiento acerca de esta enfermedad y así estar más preparados para diseñar estrategias para su prevención y erradicación.

9. CONCLUSIÓN

- Mediante el uso de diferentes marcadores moleculares se logró caracterizar genéticamente las cepas de *T. cruzi* provenientes del estado de Veracruz dentro de los DTU's TcI (Ver 4 y Ver 5) y TcVI (Ver 1, Ver 3 y Ver 6), siendo este el primer reporte del TcVI en reservorios didélfidos del estado de Veracruz.
- Al evaluar el comportamiento biológico de las cepas no se encontraron diferencias en su crecimiento.
- La transformación *in vitro* bajo distintas condiciones fue diferente en las cepas analizadas, encontrando mayor eficiencia con el medio GRACE.
- La capacidad infectiva en células VERO presentó diferencias que no fueron significativas.
- El análisis del perfil proteico y antigénico de las cepas con diversos sueros permitieron reconocer proteínas únicas del DTU que pueden ser utilizadas para su identificación.

10. PERSPECTIVAS

- Profundizar en el estudio de la proteómica de *T. cruzi* con las cepas del estado de Veracruz para indagar si las diferencias de infección se debe a la expresión de proteínas específicas.
- Establecer y caracterizar la infección de las cepas del estado de Veracruz en un modelo murino para conocer el tropismo, parasitemia en circulación, daño patológico y mortalidad que producen.

11. REFERENCIAS

1. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW.(2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 59 (5): 429-493 DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
2. Andrade LO, Galvão LM, Meirelles Mde N, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. (2010) Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105 (6): 834-837
3. Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. (2003) Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2 (3): 201-208.
4. Bayer-Santos E, Cunha-e-Silva NL, Yoshida N, Franco da Silveira J. (2013) Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasit Vectors.* 1 (6): 127. DOI: 10.1186/1756-3305-6-127.
5. Bosseno MF, Barbabé C, Gastelúm EM, Lozano F, Ramsey J, Espinoza B, Brenière SF. (2001) Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol.* 4 (2): 627-632 DOI: 10.1128/JCM.40.2.627-632.2002
6. Bosseno MF, Barnabé C, Ramirez MJ, Kengne P, Guerrero S, Lozano F, Ezequiel K, Gastelúm M, Brenière SF. (2009) Short Report: Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* Lineage I and II in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 80 (6): 988-991
7. Bosseno MF, García LS, Baunaure F, Gastelúm EM, Soto M, Lozano F, Dumonteil E, Brenière SF. (2006) Short report: Identification in Triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 74 (2): 303-305.
8. Brenière SF, Bosseno MF, Magallón-Gastelúm E, Castillo Ruvalcaba EG, Gutierrez MS, Montaña Luna EC, Basulto JT, Mathieu-Daudé F, Walter A, Lozano-Kasten F. (2007) Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. *Acta Trop.* 101 (3): 249-257.
9. Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery E, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck G, Dujardin JC, Tibayrenc M. (2003) Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2 (3): 173-183.

10. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 31 (11): 1218-1226.
11. Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizan JM, Bustamante N, Carlier Y, Ciganda A, DelCid JH, Dumonteil E, Gamboa-León R, García JA, Gibbons L, Graiff O, Maldonado JG, Herrera C, Howard E, Lara LS, López B, Matute ML, Ramírez-Sierra MJ, Robles MC, Sosa-Estani S, Truyens C, Valladares C, Wesson DM, Zuniga C. (2017) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: an observational prospective study. *Am J Trop Med Hyg.* [Epub ahead of print]. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0516.
12. Burns JM Jr, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, Reed SG. (1992) Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (4): 1239-1243.
13. Carabarin-Lima A, Gonzales-Vázquez C, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López P, Arce-Fonseca M. (2013) Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop.* 127 (2): 126-135. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.04.007
14. Cardoso M, Reis-Cunha J, Bartholomeu D. (2016) Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front Immunol.* 6 (659): 1-15 DOI: 10.3389/fimmu.2015.00659
15. Cervantes-Landín AY, Martínez I, Schabib M, Espinoza B. (2014) High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania spp.* in serological diagnosis tests. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 365403. DOI: 10.1155/2014/365403.
16. Clemente TM, Cortez C, Novaes Ada S, Yoshida N. (2016) Surface molecules released by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms downregulate host cell invasion. *PLoS Negl Trop Dis.* 10 (8): e0004883. DOI 10.1371/journal.pntd.0004883.
17. CONABIO (2006) Portal de Geoinformación. Sistema Nacional de Información Sobre Biodiversidad. Información consultada: 25/07/2017 en: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/biodiv/distpot/dpmamif/dpmdid/el/did_virggw
18. Contreras VT, Araque W, Delgado VS. (1994) *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89 (2): 253-259
19. Contreras VT, De Lima R, Ana R, Navarro A. María C. (2006) *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: relevant factors for in vitro differentiation. *Acta Biol.* 26 (2): 49-60.
20. Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. (2006) Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101 (4): 345-354.
21. Da Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR and Teixeira MG. (2004b) Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology.* 129 (Pt 5): 549-61.
22. De Necochea R, y Canul JC. (2004) Métodos fisicoquímicos en biotecnología: secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos. 48 pp.

23. De Souza W, Ulisses de Carvalho TM, Santos BE. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010. DOI:10.1155/2010/295394.
24. De Souza W. (1999) A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (1): 17-36.
25. De Souza W. (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8 (4):269-85
26. Dirección general de Epidemiología, Anuario de Morbilidad 1984-2016 para la Tripanosomiasis Americana. Consultado el: 14 de abril del 2018. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
27. Dorn PL, McClure AG, Gallaspy MD, Waleckx E, Woods AS, Monroy MC, Stevens L. (2017) The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 (9): e0005878. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005878.
28. Dumonteil E. (1999) Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública Mex.* 41 (4): 322-327.
29. Espinoza B, Rico T, Sosa S, Oaxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero M, Martínez I. (2010) Mexican *Trypanosoma cruzi* T. *cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and celular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol.* 2010 (2010): 890672. DOI: 10.1155/2010/890672.
30. Espinoza B, Solorzano N, Vizcaino A, Martínez I, Elias AL, Rodríguez JA. (2011) Gastrointestinal infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: different degrees of colonization and diverse immune responses. *Int J Biol Sci.* 7 (9): 1357-70.
31. Ferguson MA, Snary D, Allen AK. (1985) Comparative compositions of cell surface glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochim Biophys Acta.* 842 (1): 39-44.
32. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. (2007) Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Med Clin.* 148 (3): 125-131. DOI:10.1016/j.medcli.2016.10.038
33. Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta J, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves V, Teixeira S, Chiari E, Junqueira A, Fernandes O, Macedo A, Machado C, Pena S. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2 (3): e24. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020024
34. Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Nascentes GA, Batista LR, Kappel HB, Martinez-Ibarra JA, Trujillo Contreras F, Lages-Silva E, Ramírez LE. (2011) Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44 (6): 684-690.
35. Guzman-Marin E, Jimenez-Coello M, Puerto-Solis M, Ortega-Pacheco A, Acosta-Viana KY. (2012) Influence of *Triatoma dimidiata* in Modulating the Virulence of *Trypanosoma cruzi* Mexican Strains. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012 (2012): 328091. DOI: 10.1155/2012/328091
36. Ibáñez-Cervantes G, Martínez A, Noguera B, López E, Alonso AL, Perea C, Maldonado T, Hernández JM, León G. (2013) Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitol Int.* 62 (1): 36-43. DOI: 10.1016/j.parint.2012.09.003.

37. Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña N, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. (2016) Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasit Vectors*. 9 (1): 631. DOI: 10.1186/s13071-016-1918-2
38. Kikuchi SA, Sodr e CL, Kalume DE, Elias CG, Santos AL, de Nazar e Soeiro M, Meuser M, Chapeaurouge A, Perales J, Fernandes O. (2010) Proteomic analysis of two *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 strains. *Exp Parasitol*. 126 (4): 540-551. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.005.
39. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Hongberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 27 (1): 37-58.
40. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles M. (2011) Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 (10): e1363. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001363.
41. López-Cancino S, Tun-Ku E, De la Cruz HK, Ibarra CN, Izeta A, Pech A, Mazariegos CJ, Valdez A, Ramsey J. (2015) Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Trop*. 151 (2015): 58-72. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.07.021.
42. López-Olmos V, Pérez-Nasser N, Pi ero D, Ortega E, Hernandez R, Espinoza B. (1998) Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 69 (3): 239–254. DOI: 10.1016/S0001-706X(97)00131-9
43. Machado C, Ayala F. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *PNAS*. 98 (13): 7396-7401. DOI: 10.1073/pnas.121187198.
44. Magallón-Gast lum E, Lozano-Kasten F, Gutierr ez MS, Flores-Pérez A, Sánchez B, Espinoza B, Bosseno MF, Brenière SF. (2006) Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of *Phyllosoma* complex in the occidental part of Mexico. *Acta Trop*. 97 (3): 331-338.
45. Málaga S, Yoshida N. (2001) Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun*. 2001 69 (1): 353-359.
46. Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, G rtler RE, Schijman AG. (2005) PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*. 132 (Pt 1): 57-65. DOI: 10.1017/S0031182005008772.
47. Marcili A, Lima L, Cavazzana MJr, Junqueira ACV, VeludoH, Da Silva FM, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, and Teixeira MG. (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. *Parasitol*. 136 (6): 641-655. DOI: 10.1017/S0031182009005861.
48. Martínez FH, Villalobos GC, Cevallos AM, De la Torre P, Laclette JP, Alexandre-Aguilar R, Espinoza B. (2006) Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 41 (2): 279-287. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.05.002
49. Messenger LA, Llewellyn M, Bhattacharyya T, Franz n O, Lewis M, Ramírez J, Carrasco H, Andersson B, Miles M. (2012) Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy

- in *Trypanosoma cruzi* revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 6 (4): e1584. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001584.
50. Messenger LA, Miles MA, Bern C. (2015) Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 3 (8): 995-1029. DOI: 10.1586/14787210.2015.1056158.
 51. Ministerio de salud (2010) Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas. Santiago, Minsal. 35 pp.
 52. Muskus C, Marin M. (2002) Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 22 (2): 168-177. DOI: 10.7705/biomedica.v22i2.1156.
 53. Oliveira M, Branquinho R, Alessio G, Mello C, Nogueira-de-Paiva N, Carneiro C, Toledo M, Reis A, Martins-Filho O, Lana M. (2017) TcI, TcII and TcVI *Trypanosoma cruzi* samples from Chagas disease patients with distinct clinical forms and critical analysis of in vitro and in vivo behavior, response to treatment and infection evolution in murine model. *Acta Tropica*. 167: 108-120. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.11.033
 54. Organización panamericana de la salud (OPS)/HDM/CD/425-06. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Disponible en: <http://ops-uruguay.bvsalud.org/pdf/chagas19.pdf>
 55. Organización panamericana de la salud (OPS) /organización mundial de la salud (WHO) (2012) XIV Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA) para la interrupción de la transmisión vectorial, transfusional y atención médica de la enfermedad de Chagas. Belice, Belice. pp. 77.
 56. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. (2010) Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 4 (11): e899. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000899.
 57. Ramos-Ligonio A, López A, Guzmán D, Rosales JL, Limón Y, Dumonteil E. (2010) Identification of a hyperendemic area for *Trypanosoma cruzi* infection in central Veracruz, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 83 (1): 164-170. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0677.
 58. Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, Lopez-Monteon A, Dumonteil E. (2012) Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Genet Evol*. 12 (7): 1341-1343. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.04.024.
 59. Rassi A Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas Disease. *Lancet*. 375 (9723): 1388-1402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
 60. Rassi A Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 26 (2): 275-291. DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.002.
 61. Rodrigues CJ. (2015) The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions- A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110 (3): 277-282. DOI: 10.1590/0074-0276140362
 62. Rodríguez-González I, Marín C, Hitos A, Rosales M, Gutierrez-Sánchez R, Sánchez-Moreno M. (2004) Biochemical characterization of new strains of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* isolates from Peru and Mexico. *Parasitol Res*. 94 (4): 294-300. DOI 10.1007/s00436-004-1214-5

63. Roelling M, Savage M, Fuijita W, Barnabé C, Tibayrend M, Steurer F, Yadsley M. (2013). Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *PLoS One*. 8 (2): e56198. DOI: 10.1371/journal.pone.0056198.
64. Rojas OE. (2009) Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la Republica Mexicana. Tesis M. en C. UNAM. Inst. Inv. Biomédicas 107 p.
65. Salazar-Schettino PM, Bucio TM, Rojas WG, Guevara GY, Ruiz HA, Gonzáles LL, Marín LR, Romero ES, Terán TX, Infante RL. (2006) Manual para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. UNAM. 79 pp.
66. Sánchez-Guillén MC, Bernabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Méndez-López J, González-Mejía ME, Torres-Rasgado E, López-Colombo A, Pérez-Fuentes R. (2006) *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101 (6): 585-590.
67. San Francisco J, Barría I, Gutiérrez B, Neira I, Muñoz C, Sagua H, Araya JE, Andrade JC, Zailberger A, Catalán A, Remonsellez F, Vega JL, González J. (2016) Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes Infect*. 19 (1): 55-61. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.08.003
68. Schmunis G, Yadon Z. (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 115 (1-2): 14-21. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
69. Seco-Hidalgo V, De Pablos LM, Osuna A. (2015) Transcriptional and phenotypical heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* cell populations. *Open Biol*. 5 (12): 150-190. DOI: 10.1098/rsob.150190.
70. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. (1993) How clonal are bacteria?. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (10): 4384-4388
71. Sturm NR, Campbell DA. (2010) Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 115 (1-2): 35-43. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.08.018.
72. Tapia V, Galdames O, Ramírez G. (2012) Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 27 (2): 10-19.
73. Toso M, Vial UF, Galanti N. (2011) Review, oral transmission of Chagas' disease. *Rev Med Chil*. 139 (2): 258-266. DOI: /S0034-98872011000200017.
74. Urményi TP1, Silva R, Rondinelli E. (2014) The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*. 2014(74): 119-135. DOI: 10.1007/978-94-007-7305-9_5.
75. Vallejo M, Monteón-Padilla VM, Reyes P, Hernández-Becerril N, Camacho-Maire M, Hernández-Vicencio C, Olivera-Mar A. (2006) Cardiopatía chagásica crónica en el Hospital General de zona N° 24 IMSS. Poza Rica, Veracruz. *Medigraphic Artemina*. 76 (3): 269-276.
76. Verissimo da Costa GC, Lery LM, Da Silva ML, Moura H, Peralta RH, von Krüger WM, Bisch PM, Barr JR, Peralta JM. (2012) The identification and characterization of epitopes in the 30-34 kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. *J Proteomics*. 27 (80): 34-42. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.11.001.
77. Westenberger S, Bernabé C, Campbell D, Sturm N. (2005) Two Hybridization events define the popular structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 171 (2): 527-543. DOI: 10.1534/genetics.104.038745.

78. World Health Organization (WHO) (2017) Chagas disease (American Trypanosomiasis). Información consultada: 25/07/2017 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
79. World health organization (WHO) on behalf of the special programme for research and training in tropical diseases (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina. pp. 104.
80. World health organization (WHO), expert committee on the control of Chagas disease (2002) Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Series: 905; pp 120.
81. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 (7): 1051-1054. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700021.
82. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm N. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 12 (2): 240-253. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.

12. ANEXOS

```

TcI      ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
Ver4     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
Ver5     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
Ver1     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
Ver3     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
Ver6     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
TcVI     ATGTCAGGTTGTTTATATAGGATATATGGAGTGGGGTTTCAGTTTAGGTCATATTTATTATG
*****
TcI      TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
Ver4     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
Ver5     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
Ver1     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
Ver3     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
Ver6     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
TcVI     TTACAGATAAATATGTGGTGTCTGCTTAGCATGAATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCA
*****
TcI      AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGACITTTGATTTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
Ver4     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGACITTTGATTTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
Ver5     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGACITTTGATTTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
Ver1     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGATTTTGTGATTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
Ver3     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGATTTTGTGATTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
Ver6     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGATTTTGTGATTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
TcVI     AATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAGATTTTGTGATTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATT
*****
TcI      CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
Ver4     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
Ver5     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
Ver1     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
Ver3     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
Ver6     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
TcVI     CATATCTGTTTACTTCCTTTCATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATA
*****
TcI      ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
Ver4     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
Ver5     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
Ver1     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
Ver3     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
Ver6     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
TcVI     ATATTGGTAATTTTATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTT
*****
TcI      ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
Ver4     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
Ver5     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
Ver1     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
Ver3     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
Ver6     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
TcVI     ATGTTTATAAATAATTATTGCATTTATTGGATACGTGTTACCATGTACAATGATGCTTAT
*****

```



```

TcI      TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCTACTGTTCTCTGTATTCGGCCAGTGATTA
Ver4     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCTACTGTTCTCTGTATTCGGCCAGTGATTA
Ver5     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCTACTGTTCTCTGTATTCGGCCAGTGATTA
Ver1     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTCAGTGATTG
Ver3     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTCAGTGATTG
Ver6     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTCAGTGATTG
TcVI     TGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTCAGTGATTG 420
*****

```

```

TcI      TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
Ver4     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
Ver5     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
Ver1     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
Ver3     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
Ver6     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT
TcVI     TGTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACT 473
*****

```

Anexo 1. Alineamiento del gen de citocromo B de las cepas del estado de Veracruz con cepas de referencia TcI (Silvio X10 cl1) y TcVI (CL-Brener). Se hizo un alineamiento global de las cepas TcVI y TcI, los pares de bases que varían se señalan con la ausencia de asterisco (*). En cuadros rojos se resaltan las bases que cambian en TcI con respecto a TcVI (cuadros azules), en verde se marca el cambio de base dentro mismo DTU TcI.

```

TcI      TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
Ver4     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
Ver5     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
Ver1     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
Ver3     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
Ver6     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA
TcVI     TGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTCTAAGGCGCAATGGTTTAGTCCCATCCA 60
****

```

```

TcI      CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGACATATTAGAAACAAAAAA
Ver4     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGACATATTAGAAACAAAAAA
Ver5     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGACATATTAGAAACAAAAAA
Ver1     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGAC--ATTAGAAACAAAAAA
Ver3     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGAC--ATTAGAAACAAAAAA
Ver6     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGAC--ATTAGAAACAAAAAA
TcVI     CTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGTGGTCCGTGAACAGAC--ATTAGAAACAAAAAA 120
*****

```

```

TcI      CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
Ver4     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
Ver5     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
Ver1     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
Ver3     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
Ver6     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG
TcVI     CACGGGAGTGGTACCTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATGCCAGAGGGCGCCCGTG 180
*****

```

TcI ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 Ver4 ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 Ver5 ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 Ver1 ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 Ver3 ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 Ver6 ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC
 TcVI ATTTTTTACTGTGACTAAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAATTAGAAAAGC 240

TcI ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 Ver4 ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 Ver5 ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 Ver1 ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 Ver3 ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 Ver6 ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT
 TcVI ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGT 300

TcI CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACAGC
 Ver4 CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACAGC
 Ver5 CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACAGC
 Ver1 CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACATACAC
 Ver3 CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACATACAC
 Ver6 CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACATACAC
 TcVI CCATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACATACAC 360
 ***** ** *

TcI ACACICCTTTTTTGGATGTTGTGCTTCTGTGTTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 Ver4 ACACICCTTTTTTGGATGTTGTGCTTCTGTGTTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 Ver5 ACACICCTTTTTTGGATGTTGTGCTTCTGTGTTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 Ver1 ACTCCCTTTTTTGG-GACSTGT-TTGTATGTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 Ver3 ACTCCCTTTTTTGG-GACSTGT-TTGTATGTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 Ver6 ACTCCCTTTTTTGG-GACSTGT-TTGTATGTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA
 TcVI ACTCCCTTTTTTGG-GACSTGT-TTGTATGTGTGTTGGCACTCGTCGCC-TTTGTGGGA 420
 ** *

TcI AATCCGTGTGGCACTTGTITGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTTACACACACGTT
 Ver4 AATCCGTGTGGCACTTGTITGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTTACACACACGTT
 Ver5 AATCCGTGTGGCACTTGTITGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTTACACACACGTT
 Ver1 AA-----
 Ver3 AATCCGTGTGGCACT--GTTTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTT--CGCATC
 Ver6 AATCCGTGTGGCACT--GTTTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTT--CGCATC
 TcVI AATCCGTGTGGCACT--GTTTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTAGCCTT--CGCATC 480
 ***** ** *

TcI TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG
 Ver4 TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG
 Ver5 TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG
 Ver1 -----
 Ver3 TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG
 Ver6 TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG
 TcVI TCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGG 540

```

TcI      GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG
Ver4     GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG
Ver5     GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG
Ver1     -----
Ver3     GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG
Ver6     GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG
TcVI    GGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACCAAGACGAACTACAG 600
*****

TcI      CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT
Ver4     CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT
Ver5     CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT
Ver1     -----
Ver3     CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT
Ver6     CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT
TcVI    CGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCACAAAGTGTGGGGATCGAAGAT 660
*****

TcI      GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
Ver4     GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
Ver5     GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
Ver1     -----
Ver3     GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
Ver6     GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
TcVI    GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT 720
*****

TcI      GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATATTATTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCC-A
Ver4     GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATATTATTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAA
Ver5     GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATATTATTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCC-A
Ver1     -----
Ver3     GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATTTTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCC-A
Ver6     GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATTTTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCC-A
TcVI    GGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTTATTTTTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCC-A 780
*****

TcI      ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCGTT-TTTTTTTACGGCGA
Ver4     ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCG-TTTTTTTACGGCGA
Ver5     ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCGTT-TTTTTTTACGGCGA
Ver1     -----
Ver3     ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCG-TTTTTTTACGGCGA
Ver6     ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCG-TTTTTTTACGGCGA
TcVI    ATGAATATATTAATA-TTTACGTGCATATTC-TTTTTGGTCTTCG-TTTTTTTACGGCGA 840
**** *

TcI      GGACCTT
Ver4     GGACCTT
Ver5     GGACCTT
Ver1     -----
Ver3     GGACCTT
Ver6     GGACCTT
TcVI    GGACCTT 847
**

```

Anexo 2. Alineamiento de la fracción del gen *SSU* de las cepas del estado de Veracruz con cepas de referencia TcI (G) y TcVI (CL-Brener). En el alineamiento se observa un 94.56% de similitud en la secuencias, con presencia de GAPS observados entre DTU's (-), los pares de bases que varían se señalan con la ausencia de asterisco (*). Cada DTU presenta los mismos cambios de base, lo que permite que se agrupen juntos TcI (rojo) y TcVI (azul).