



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
(Instituto de Investigaciones Biomédicas)

“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
TRYPANOSOMA CRUZI EN LA REPÚBLICA
MEXICANA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. Eréndira Rojas Ortega

Tutor: Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutierrez

MÉXICO, D. F.

Junio/2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

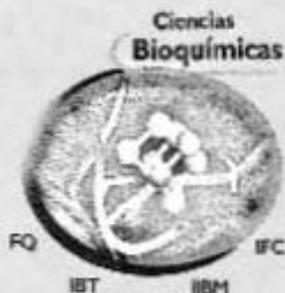


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/264/2012

ERÉNDIRA ROJAS ORTEGA
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

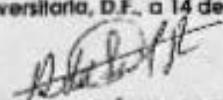
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de Marzo del presente, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana", dirigida por la Dra. Bertha J. Espinoza Gutiérrez.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Esperanza Martínez Romero
VOCAL	Dr. Abraham Landa Piedra
VOCAL	Dra. Ana María Cavallos Gao
VOCAL	Dra. Susana López Charrelon
SECRETARIO	Dr. Luis Padilla Noriega

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de Marzo de 2012.


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
COORDINADOR DE ENTIDAD

C.c.p. Archivo

RRS/09



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

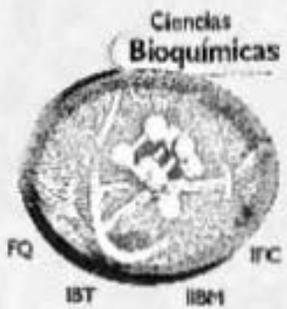
A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas **ERÉNDIRA ROJAS ORTEGA** titulada:

"Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana"

ATENTAMENTE

DRA. BERTHA J. ESPINOZA GUTIÉRREZ
TUTOR



**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

Of. No. PMDCB/265/2012

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico;

Los miembros del Subcomité Académico en reunión del día 12 de Marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS) de la alumna ERÉNDIRA ROJAS ORTEGA, con la tesis titulada "Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana", dirigida por la Dra. Bertha J. Espinoza Cufiároz.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

PRESIDENTE	Dra. Esperanza Martínez Romero	SI <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Acepto	<i>[Firma]</i> 12/04/12 (firma y fecha)
VOCAL	Dr. Abraham Landa Piedra	SI <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Acepto	<i>[Firma]</i> 12/04/12 (firma y fecha)
VOCAL	Dra. Ana María Cevallos Gao	SI <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Acepto	<i>[Firma]</i> 16.06.2012 (firma y fecha)
VOCAL	Dra. Susana López Charetón	SI <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	Acepto	<i>[Firma]</i> 10/04/12 (firma y fecha)
SECRETARIO	Dr. Luis Padilla Noriega	SI <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Acepto	<i>[Firma]</i> 16/04/12 (firma y fecha)

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 14 de Marzo de 2012.

[Firma]
DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
COORDINADOR DE ENTIDAD

C.C.D. Archivo

Of. No. PMDCBQ/329/2012

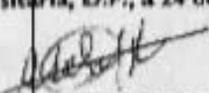
QFB. ERÉNDIRA ROJAS ORTEGA
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

En base a su oficio enviado para la solicitud de cambio de integrantes de jurado de examen, el Subcomité Académico en la sesión ordinaria del día 23 de Abril del presente acordó:

"Aceptar el cambio de sinodal sustituyendo a la Dra. Susana López Charreón (V) por el Dr. Roberto Hernández Fernández (V)"

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Abril de 2012.


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
Coordinador de Entidad

C.c.p. Dra. Bertha Espinosa Gutiérrez, Tutor académico
C.c.p. Archivo

RRSP/gg

Acepto ser sinodal
Panduro



11 mayo 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana”**, que para obtener el grado presenta el (la) alumno(a) **Erendira Rojas Ortega** con número de cuenta **405069235**, inscrito(a) en la Maestría () el Doctorado () en **Ciencias Bioquímicas**, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,


Nombre y firma
Dra. M. Esperanza Martínez Romero

2 de mayo 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar
UNAM
PRESENTE

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“Estudio de la diversidad genética de Trypanosoma cruzi en la Republica Mexicana”**, que para obtener el grado presenta el (la) alumno(a) **Eréndira Rojas Ortega** con número de cuenta **405069235**, inscrito(a) en la Maestría (x) el Doctorado () en **Ciencias Bioquímicas**, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente



Abraham Leanda Piedra

Nombre y firma

9 mayo 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana”**, que para obtener el grado presenta el (la) alumno(a) **Erendira Rojas Ortega** con número de cuenta **405069235**, inscrito(a) en la Maestría () el Doctorado () en **Ciencias Bioquímicas**, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Nombre y firma

Ana María Cevallos Gaos.

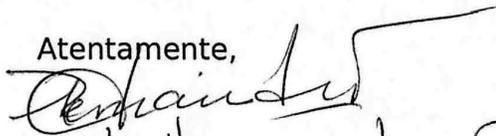
9 mayo 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana”**, que para obtener el grado presenta el (la) alumno(a) **Erendira Rojas Ortega** con número de cuenta **405069235**, inscrito(a) en la Maestría () el Doctorado () en **Ciencias Bioquímicas**, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,


Dr. Roberto Hernández Fernández
Nombre y firma

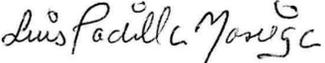
2 de mayo 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado "**Estudio de la diversidad genética de Trypanosoma cruzi en la Republica Mexicana**", que para obtener el grado presenta el (la) alumno(a) **Eréndira Rojas Ortega** con número de cuenta **405069235**, inscrito(a) en la Maestría (x) el Doctorado () en **Ciencias Bioquímicas**, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente


DR. LUIS PADILLA NORIEGA
Nombre y firma

Agradecimientos

Le agradezco a la Doctora Bertha Espinoza Gutiérrez, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio; a mi comité tutorial, la Doctora Clara Espitia Pinzón y al Doctor Ruy Pérez Montfort por sus comentarios durante el desarrollo del proyecto; Al Doctor Juan Pedro Laclette y la Maestra en Ciencias Patricia de la Torre por la secuenciación de los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial; al Doctor Fernando Martínez por la ayuda en el análisis filogenético; al Maestro en Ciencias Ignacio Martínez por el apoyo en el cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* empleados para la obtención de ADN; a Leticia García por su ayuda en la realización de los tramites de titulación, a los proyectos DGAPA IN 206512 y PICSA 10-130 del gobierno del Distrito Federa por el financiamiento; y finalmente a Conacyt por la beca que me otorgó durante el curso de la maestría.

Dedicatoria

Le agradezco a la vida por darme la oportunidad de encontrar mi verdadero camino, a mis padres por apoyarme en todo momento, a mis hermanos Jesús e Isaías por ser parte de mi vida, a mi abuela Lucha y mi tía Marcela por ser un ejemplo de fortaleza, a Israel por apoyarme a pesar de todo, a Yamile y Melissa por ser como mis hermanas, a Julio y Natalia por ser amigos tan entrañables que ya los considero parte de mi familia, a Jany por permitirme enseñarle un poquito de lo que se, al Dr. Santiago Ávila Ríos y Maribel por su apoyo incondicional, a Ana Lucrecia por todos sus consejos, a María por escucharme, a mis amigas del laboratorio Ana Erika, Ángela, Alejandra, Génesis, Mirna y Mariana por los buenos momentos que hemos pasado, a mis amigas del posgrado Tania y Claudia por su amistad, al Sr. Osvaldo por toda su ayuda, sin el la maestría habría sido terrible, a Hilda por todo su apoyo, a David por enseñarme que el Ingles no es tan aburrido y finalmente, a Titán y Tulio por darle tanta alegría a mi vida. Gracias a todos ustedes sin su apoyo no lo hubiese logrado, todos ustedes tienen un lugar muy especial en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	15
1.0 INTRODUCCIÓN	17
1.1 PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL MUNDO	17
1.2 PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO	18
1.3 BIOLOGÍA DE <i>T. CRUZI</i>	20
1.3.1 TAXONOMÍA DE <i>T. CRUZI</i>	20
1.3.2 MORFOLOGÍA DE <i>T. CRUZI</i> A TRAVÉS DE SU CICLO DE VIDA	20
1.3.3 CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. CRUZI</i>	21
1.3.4 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	22
1.4.0 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	23
1.5 GENOMA DE <i>T. CRUZI</i>	24
1.6 ORIGEN DEL GÉNERO <i>TRYPANOSOMA</i> Y DIVERGENCIA DE <i>T. CRUZI</i>	25
1.7 INTERRELACIÓN ENTRE DIVERSIDAD GENÉTICA Y PATOGÉNESIS	26
1.8 VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>T. CRUZI</i>	27
1.9 ORIGEN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	30
1.10 SELECCIÓN CLONAL EN <i>T. CRUZI</i>	31
1.11 DISTRIBUCIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LOS VARIANTES GENÉTICOS DE <i>T. CRUZI</i>	31
1.12.0 VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>T. CRUZI</i>	32
1.12.1 ANÁLISIS POR MEDIO DE MICROSATÉLITES	32
1.12.2 ANÁLISIS POR MEDIO DE LSSP PCR	34
1.12.3 ANÁLISIS GEN MINI-EXÓN	35
1.12.4 ANÁLISIS GEN CITOCROMO B MITOCONDRIAL	38
1.13 VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>T. CRUZI</i> EN MÉXICO	40
2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
3.0 HIPÓTESIS	44
4.0 OBJETIVO	44
5.0 METODOLOGÍA	45
5.1.0 ANÁLISIS POR MEDIO DE MICROSATÉLITES	45
5.1.1 SELECCIÓN DE CEPAS	45
5.1.2 DESCONGELACIÓN DE CEPAS	46
5.1.3 OBTENCIÓN DE PARÁSITOS DE 57 CEPAS DIFERENTES	46
5.1.4 EXTRACCIÓN ADN DE <i>T. CRUZI</i>	47
5.1.5 CUANTIFICACIÓN DE ADN	48
5.1.6 AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES	48
5.1.7 ANÁLISIS BAYESIANO DE PATRÓN DE BANDEO DE LOS DIFERENTES MICROSATÉLITES	49
5.2.0 SEGUNDO ANÁLISIS DE CEPAS REPRESENTATIVAS CON MICROSATÉLITES	49
5.3.0 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE GEN <i>SL</i> MINI-EXÓN Y CITOCROMO B MITOCONDRIAL	49
5.3.1 AMPLIFICACIÓN GEN <i>SL</i> MINI-EXÓN	49
5.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE 950 PB DE CITOCROMO B	50
5.3.3 EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	50
5.3.4 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	50
5.3.5 EDICIÓN Y OBTENCIÓN DE SECUENCIA CONSENSO DE LAS SECUENCIAS FRW Y RVS	51
5.4.0 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	51
5.4.1 ANÁLISIS BAYESIANO	52
5.4.2 ANÁLISIS DE REDES MEDIAN JOINING (MJ)	52

6.0 RESULTADOS	53
6.1.0 ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES	53
6.1.1 DESCRIPCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO	53
6.1.2 ANÁLISIS DE GELES DE ACRILAMIDA AL 12% DE PRODUCTOS DE PCR DE MICRO SATÉLITES	54
6.1.3 ANÁLISIS BAYESIANO DE MATRIZ BINARIA	57
6.2.0 SEGUNDO ANÁLISIS CON MICROSATÉLITES MEJORANDO CONDICIONES	58
6.2.1 ANÁLISIS BAYESIANO DE MICROSATÉLITES SCLE 1-2	60
6.3.0 ANÁLISIS FILOGENÉTICO SL MINI-EXÓN	63
6.3.1 ANÁLISIS BAYESIANO DE LAS SECUENCIAS SL MINI-EXÓN	69
6.3.2 ANÁLISIS DE RED MEDIAN JOINING (MJ) DE SL MINI-EXÓN	71
6.3.3 ANÁLISIS DE RED MEDIAN JOINING (MJ) DE SL-IR MINI-EXÓN	73
6.4.0 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN MITOCONDRIAL DE CITOCROMO B	75
6.4.1 ANÁLISIS BAYESIANO DE FRAGMENTO DE GEN CITOCROMO B MITOCONDRIAL	81
6.4.2 ANÁLISIS DE RED MEDIAN JOINING DE FRAGMENTO DEL GEN CITOCROMO B MITOCONDRIAL	83
6.5.0 ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS GENES SL MINI-EXÓN Y CITOCROMO B MITOCONDRIAL	83
6.5.1 ANÁLISIS BAYESIANO DE CONJUNTO DE LOS GENES: SL MINI-EXÓN Y FRAGMENTO DE CITOCROMO B MITOCONDRIAL	84
6.6.0 INTEGRACIÓN DE TODOS LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS CEPAS TcI	85
6.7.0 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS No TcI	86
6.7.1 ANÁLISIS BAYESIANO GEN SL MINI-EXÓN DE CEPAS NO TcI	86
6.7.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CITOCROMO B MITOCONDRIAL DEL CEPAS MEXICANAS NO Tc I	88
7.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	92
8.0 CONCLUSIONES	97
9.0 PERSPECTIVAS	98
10.0 BIBLIOGRAFÍA:	99
11.0 PAGINAS WEB CONSULTADAS:	103
<i>HTTP://TREE.BIO.ED.AC.UK/SOFTWARE/FIGTREE/</i>	103
12.0 ANEXOS	105
12.1 ANEXO 1 (ANÁLISIS BAYESIANO)	105
12.2 ANEXO 2 (ANÁLISIS DE RED MEDIAN JOINING)	106
12.3 ANEXO 3 (PESO MOLECULAR DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITE)	107

Resumen

En México la infección por *Trypanosoma cruzi* está dada principalmente por parásitos pertenecientes al grupo genético DTU TcI. Recientemente, se ha demostrado una gran variabilidad genética entre los aislados DTU TcI, esta variabilidad en parte se debe a la gran distribución de este grupo genético en Latinoamérica y a su antigüedad.

En los estudios anteriores realizados a aislados mexicanos, únicamente se ha evaluado un solo tipo de marcador molecular, lo cual limita las conclusiones obtenidas. En el presente estudio se evaluaron 15 cepas mexicanas de *T. cruzi*, de las cuales 13 pertenecían al DTU TcI, usando tres diferentes marcadores moléculas: Microsatélites, análisis del gen mini-exón y análisis del gen mitocondrial de citocromo B.

Al realizar el análisis genético de las cepas TcI, fue posible distinguir que con el microsatélite SCLE 1-2 las cepas TcI se podían clasificar en dos genotipos diferentes, los cuales están asociados al origen biológico de cada cepa. En cuanto al análisis del gen Spliced Leader (SL) mini-exón, se encontró que la mayor parte de las cepas mexicanas pertenecían al grupo genético Tc Ia, a pesar de ello fue posible encontrar entre las cepas mexicanas, cepas pertenecientes a otros subgrupos genéticos de TcI. Como las cepas CRISTI, Mor 11 y Col 7 que pertenecen al grupo genético Tc Id, y que las cepas CopGro y JBE que junta con algunas cepas colombianas forman un nuevo grupo genético el cual denominamos Tc If. Al realizar el análisis del gen mitocondrial de citocromo B, fue posible observar gran homogeneidad entre las cepas mexicanas, a pesar de ello al compararlas con aislados provenientes de otros países se encontró que las cepas mexicanas son genéticamente diferentes a las cepas de otros países.

El análisis filogenético de las cepas mexicanas que no pertenecían al DTU TcI y analizar los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial fue posible distinguir que los aislados pertenecen a alguno de los DTUs híbridos, como son los DTUs TcV ó TcVI, con lo cual se inició el estudio de cepas mexicanas no TcI.

Al realizar un análisis en conjunto de todos los resultados obtenidos, se pudo concluir que *T. cruzi* en México presenta mayor variación genética de la que se pensaba anteriormente, a pesar de ello es necesario evaluar un mayor número de marcadores moleculares y un mayor número de aislados, así como la inclusión de clonas en los análisis.

Abstract:

In Mexico infections of *Trypanosoma cruzi* is mainly caused by parasites that belong to the genetic group DTU TcI. Recently, it has shown that TcI have a great genetic variability, this is partly because this group is distributed along Latin America, and it is one of the two ancestral groups. In previous studies of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*, ambiguous results are found, because in some of this studies they demonstrate that isolated Mexicans of TcI.

are homogenous and in others they find heterogeneity, other problem of this studies is that only they are evaluated one type of molecular marker, this fact limits the conclusions because it is difficult to make a filogenetic inference using only one marker. In the present study we evaluated 15 Mexican strains of *T. cruzi*, 13 of which belonged to the DTU TcI, in this study they evaluated three different markers: Microsatellites, SL mini-exon gene, and mitochondrial cytochrome B.

The results of the genetic analysis of Mexican strains TcI, demonstrate that it was possible to distinguish with microsatellite SCL 1-2 two different genotypes, which are associated with the biological origins of each strain. For the analysis of gene Spliced Leader (SL) mini-exon, we found that most of the Mexican strains belonged to genetic group Tc Ia, although strains of other genetic subgroups TcI could be found. For example CRISTI strains, Col 7 and Mor 11 belong to genetic group Tc Id, while they discover a new group that is made with Mexican strains JBE, CopGro and Colombian strains, this new groups we call genetic Tc If. On the other hand in the analysis of mitochondrial cytochrome B gene, it was observed great homogeneity among the Mexican strains, when they compared it isolatedly from other countries they found that the Mexican strains are genetically different from strains from other countries. Phylogenetic analysis of mini-exon genes SL and mitochondrial cytochrome B of the Mexican strains do not belong to DTU Tc I, they belong to one of the hybrid DTUs, such as TcV or TcVI DTUs. This release opens the possibility to begin the studies of Mexican strains not TcI. When performing a joint analysis of all results obtained, it was concluded that *T. cruzi* in Mexico has more genetic variation than previously thought, although it is necessary to evaluate a larger amount of molecular markers and a larger number of isolates, and the inclusion of clones in the analysis.

1.0 Introducción

1.1 Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en el mundo

La enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad también es llamada Tripanosomiasis Americana ya que el parásito se localiza primordialmente en el Continente Americano, desde la región Sur de los Estados Unidos hasta Argentina (OMS, 2010) (Figura 1.1).

La región que se encuentra más afectada en el continente es Latinoamérica, ya que enfermedad de Chagas está ligada a la presencia del vector y a las malas condiciones de vivienda que se encuentran ampliamente distribuidas en las áreas rurales de Latinoamérica (OMS, 2010; Reighthinger et al., 2009).

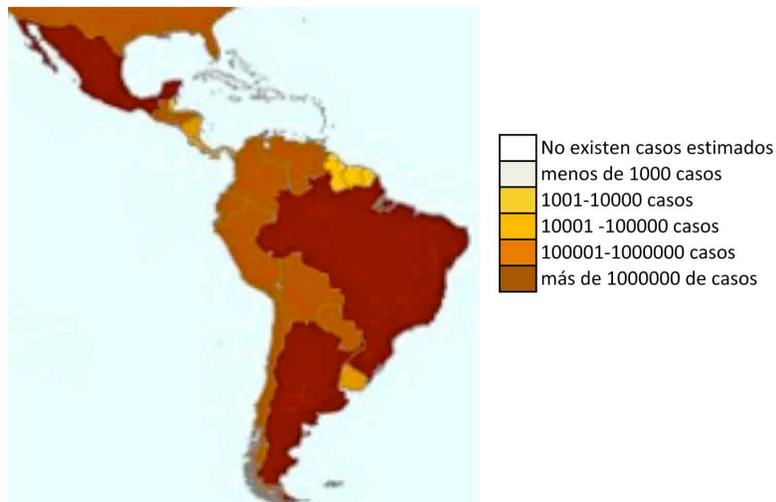


Figura 1.1 Prevalencia de la enfermedad de Chagas en America. La enfermedad de Chagas se extiende del Sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia (Figura modificada de la página de *Drugs for Neglected Diseases initiative*).

A pesar de que la mayoría de los casos reportados de la enfermedad de Chagas se encuentren concentrados en Latinoamérica se han reportado casos en Estados Unidos y Canadá al igual que en Asia (principalmente Japón), Europa (principalmente en España) y Oceanía, lo cual es un reflejo de los fenómenos migratorios (OMS, 2010; Schmunis y Yadon, 2010) (Figura 1.2).

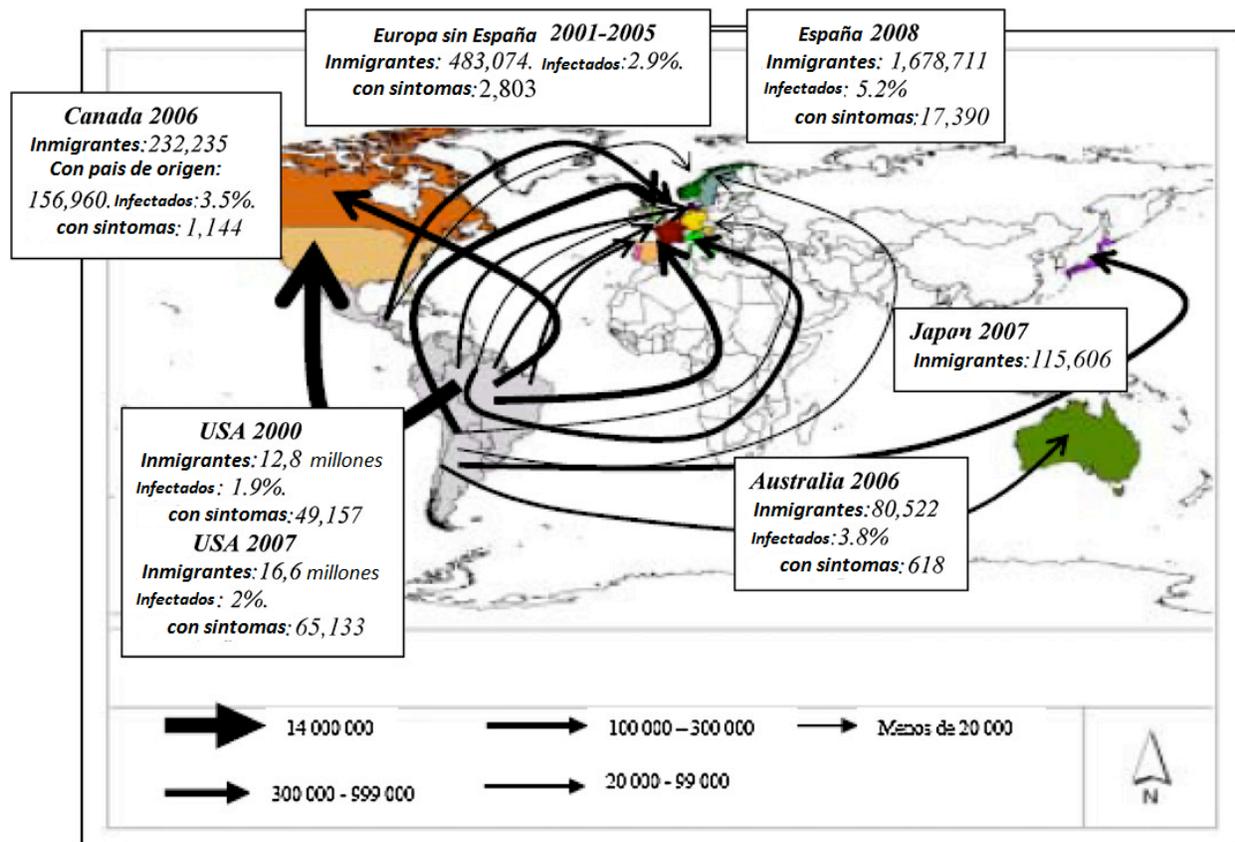


Figura 1.2 Flujo migratorio de América Latina a regiones no endémicas de la Enfermedad de Chagas. Debido a los flujos migratorios la enfermedad de Chagas se propaga a regiones no endémicas como lo son España, Japón y Australia (Schmunis & Yadon, 2010).

De acuerdo a los reportes se estima que existen aproximadamente 10 millones de individuos infectados por *T. cruzi* en Latinoamérica (Reihthinger et al., 2009; OMS, 2010). La enfermedad de Chagas causa aproximadamente 21000 muertes al año y un 10 a 15% de los enfermos presentan discapacidad como consecuencia del daño cardíaco o gastrointestinal, por tal motivo representa uno de los problemas de salud pública más grave de la región (OPS, 2008), ocupando el primer lugar en las enfermedades tropicales en Latinoamérica y el cuarto lugar en enfermedades transmisibles (Morel, 1999).

1.2 Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en México

De acuerdo a los estudios que se han realizado en los diferentes estados de la República Mexicana se ha encontrado que la enfermedad de Chagas se encuentra distribuida lo largo de la República. En la encuesta nacional de seroprevalencia realizada en la década de los noventa, se encontró que la prevalencia promedio era del 0.2% con porcentajes variables en los diferentes estados, concentrándose la mayor parte de los casos en la región sureste y costa occidental de la República Mexicana (Martínez y Espinoza en prensa). En las regiones que se encuentran mayormente

afectadas es posible encontrar de un 5 a 20% de seroprevalencia (Salazar- Schettino, 2003) (Figura 1.3).

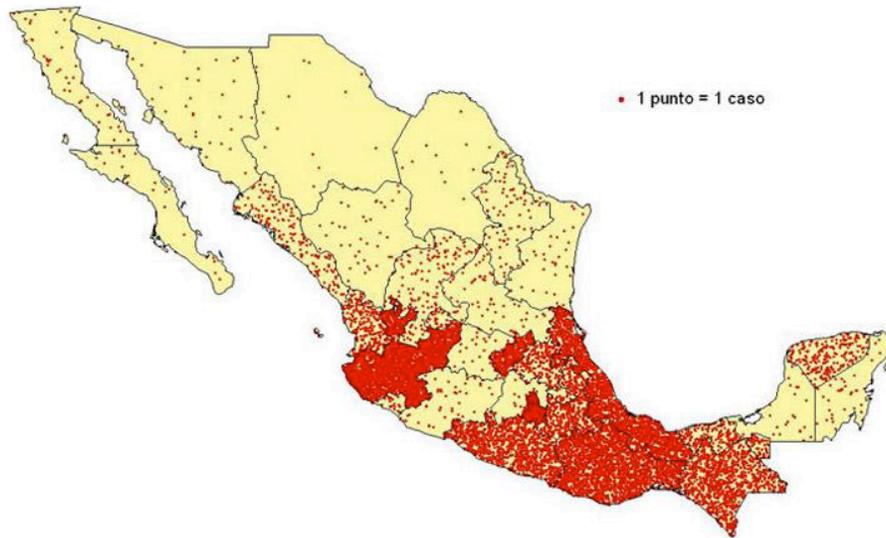


Figura 1.3 Casos de Enfermedad de Chagas en México del año 1928 a 2004. De acuerdo a los registros de la enfermedad de Chagas obtenidos entre los años 1928 a 2004, podemos observar que existe una gran heterogeneidad en la seroprevalencia en los diversos estados (<http://www.unibio.unam.mx/chagamex>).

Los estados de la República Mexicana que se encuentran mayormente afectados son Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Chiapas, Morelos y Querétaro (<http://www.unibio.unam.mx/chagamex>) (Figura 1.4).

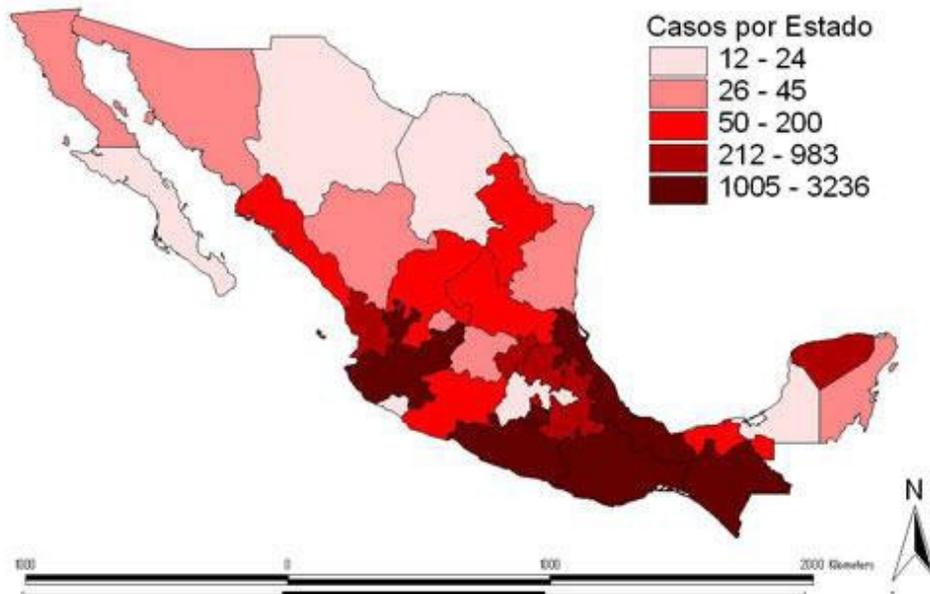


Figura 1.4 Casos de Enfermedad de Chagas 1930 a 2004 en los diferentes estados de la República Mexicana. De acuerdo a los registros se encontró que las regiones que se encuentran mayormente afectadas son la región sureste y la costa occidental del país.

1.3 Biología de *T. cruzi*

1.3.1 Taxonomía de *T. cruzi*

T. cruzi, es un parásito flagelado y digénico. Pertenece al Phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, perteneciente al orden Kinetoplastida que comprende organismos flagelados con un cinetoplasto, éste último es ADN mitocondrial localizado en la mitocondria que contiene una red de minicirculos y maxicirculos concatenados. *T. cruzi* está incluido en la sección estercolaría esto es, en el grupo de tripanosomas de los cuales sus estadios infectivos se desarrollan en el tracto digestivo del vector e infectan a los hospederos mamíferos a través de las heces. El subgénero *Schizotrypanum* comprende tripanosomas que infectan vertebrados vía estadio intracelular, por lo tanto, como éste es el caso del parásito el nombre es: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (OMS) (Figura 1.5).

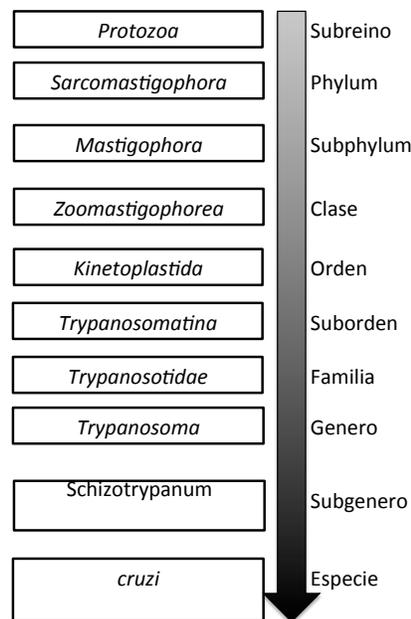


Figura 1.5 Clasificación Taxonómica de *T. cruzi* (OMS). *T. cruzi* pertenece al Phylum Sarcomastigophora, al orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, al género Trypanosoma y a la especie cruzi.

1.3.2 Morfología de *T. cruzi* a través de su ciclo de vida

T. cruzi presenta estructuras celulares características de un organismo eucarionte, pero al pertenecer al grupo de los cinetoplastidos cuenta con una estructura llamada “saco flagelar”, la cual sirve para realizar la endocitosis y la exocitosis. Otra estructura particular de este grupo es el “cinetoplasto” el cual es ADN extracromosomal localizado en un punto específico de la mitocondria. El cinetoplasto representa de un 10 hasta un 20% del ADN total del parásito (*Espinoza- Gutiérrez y Maning-Cela, 2007*).

En *T. cruzi* existen tres formas principales del parásito: tripomastigote, epimastigote y amastigote. Estas tres morfologías del parásito se pueden diferenciar entre sí gracias a la posición del

cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de membrana ondulante (*Espinoza-Gutiérrez y Maning-Cela, 2007*). (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Diferentes formas de *T. cruzi* *

Estadio	Amastigote	Epimastigote	Tripomastigote
Descripción	Es un estadio esférico casi inmóvil el cual mide entre 2 y 5 µm, el cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo, no tiene flagelo libre y carece de membrana ondulante. Esta estructura se divide por fisión binaria.	Tiene forma de huso 20 a 40 µm, su cinetoplasto se localiza en la parte media del parásito justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante. En esta fase del ciclo se encuentra en una fase proliferativa.	Mide aproximadamente 25 µm de longitud y 2 µm de diámetro, el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo de todo el cuerpo, formando una membrana ondulante y emergiendo en forma libre en su extremo anterior. Es la forma infectiva del parásito y carece de capacidad replicativa.
Localización	Durante el ciclo de vida natural del parásito se encuentra en el interior de las células de los mamíferos, mientras que se cultivan experimentalmente se obtienen a partir de la transformación de tripomastigotes en medio de cultivo ácido con deficiencias de nutrientes.	Durante el ciclo de vida natural del parásito se encuentra en el intestino del vector y si se cultiva experimentalmente en cultivo axénico.	Durante el ciclo de vida natural del parásito se encuentra en la sangre del hospedero y en las heces del vector. En cultivos de epimastigotes axénico puede que se encuentren en fase estacionaria, cuando exista una deficiencia de nutrientes.

1.3.3 Ciclo biológico de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando un insecto (redúvido) del género *Triatoma* se alimenta de sangre de un huésped infectado por *T. cruzi*. El insecto ingiere tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes en el tubo digestivo del insecto se convierten en epimastigotes los cuales se replican por fisión binaria, finalmente estos epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se expulsan en las heces (*Pumaral et al., 1994; Rassi et al., 2010*).

Cuando el triatomino infectado se alimenta de un nuevo huésped deposita su contenido intestinal que contiene tripomastigotes metacíclicos sobre la piel. Éstos a través de la herida de la picadura, otras heridas próximas, folículos pilosos y mucosas sanas penetran en el tejido subcutáneo. Desde esta localización llegan a la sangre en la que difunden transportados por leucocitos, linfocitos, monocitos o como elementos libres. Estos tripomastigotes no se dividen, pero penetran en las células, especialmente las células del músculo cardíaco y Sistema Retículo Endotelial (SRE); y se transforman en amastigotes (forma intracelular). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se convierten en tripomastigotes, que son liberados al torrente circulatorio, donde adoptan la forma de tripomastigote con aspecto de letra C o U (*Pumaral et al., 1994; Rassi et al., 2010*) (**Figura 1.6**).

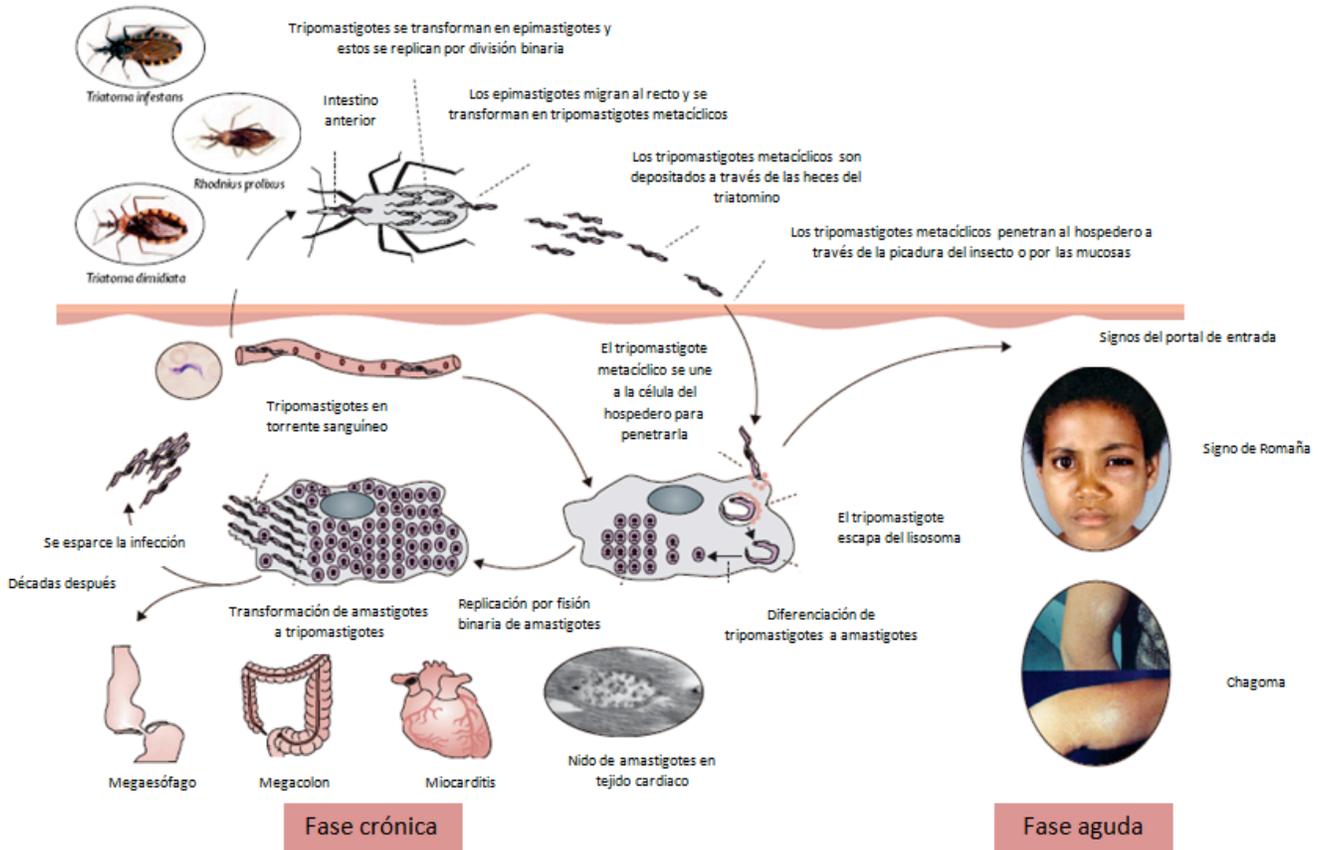


Figura 1.6 Ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo de vida de *T. cruzi* transcurre en el vector (reduvidos del género *Triatoma*) y un huésped que puede ser el hombre o un animal (Figura modificada de Rassi et al., 2010).

1.3.4 Mecanismos de transmisión de *T. cruzi*

La principal forma por la cual se trasmite *T. cruzi* es la vectorial es decir a través un insecto hematófago perteneciente al género *Triatoma*. La transmisión vectorial es la forma más común de transmisión de la enfermedad de Chagas en América Latina, a pesar de ello no es la única (http://www.sadi.org.ar/files/Manual_Chagas_2005.pdf;OMS). En México existen varias especies importantes: en el Sureste y costa del Golfo predomina *T. dimidiata*, en el centro del país *T. pallidipenis*, en el centro y occidente de México *T. longipenis* (Martínez et al., 2006) (Figura 1.7).



a) *T. dimidiata*



b) *T. longipennis*



c) *T. pallidipennis*

Figura 1.7 Principales vectores de *T. cruzi* en México a) *Triatoma dimidiata*, es el principal vector de la enfermedad de Chagas en el Suroeste y costa del Golfo de México b) *T. longipennis* es el principal vector en centro y occidente del país, c) *T. pallidipennis* se localiza en el centro del país (<http://www.unibio.unam.mx/chagamex>).

Las vías de transmisión no vectoriales, en las cuales no participa el triatomino son por medio de:

1. Transfusión sanguínea
2. Transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo (transmisión congénita)
3. Trasplantes de órganos de un individuo infectado a un individuo sano
4. Ingestión de los parásitos
5. Accidentes de laboratorio

De la vía vectorial depende el riesgo de las otras vías de transmisión. Ya que si existe transmisión vectorial existirá mayor riesgo de que exista transmisión a través de transfusiones sanguíneas y de la transmisión congénita de la enfermedad, de tal forma han existido campañas de control en los diferentes países de Latinoamérica, con lo cual se ha reducido el riesgo de infección (http://www.sadi.org.ar/files/Manual_Chagas_2005.pdf).

1.4.0 Patogenia de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas evoluciona en dos fases, aguda y crónica. La fase aguda tiene una duración de 2 a 4 meses a partir de la inoculación del parásito. En esta fase existe una alta parasitemia, por tal motivo se obtienen resultados positivos al realizar estudios parasitológicos directos en sangre como es el estudio de gota fresca, una característica importante de esta fase es que se presentan síntomas inespecíficos como lo es la fiebre. En la fase aguda es poco frecuente la aparición de síntomas específicos, por tanto es común que la infección pase desapercibida. La mayor parte de los individuos que presentan sintomatología son niños menores a 4 años o individuos inmunosuprimidos. Las expresiones clínicas graves de la fase aguda son: miocarditis y meningoencefalitis (Rassi et al., 2010; http://www.sadi.org.ar/files/Manual_Chagas_2005.pdf).

Los síntomas que se presentan son:

Síntomas inespecíficos (más frecuentes)	Síntomas específicos (menos frecuentes, 5% de los casos)
<ul style="list-style-type: none">• Síndrome febril prolongado• Adenomegalia• Hepatoesplenomegalia*• Anemia*• Anorexia*• Irritabilidad o Somnolencia• Convulsiones• Edema*	<ul style="list-style-type: none">• Complejo oftalmoganglionar• Chagoma de inoculación

*De aparición más frecuente en lactantes y niños menores de 4 años. (Rassi et al., 2010; http://www.sadi.org.ar/files/ManualChagas_2005.pdf)

Al inicio de la fase crónica existe una fase a la cual se le denomina fase crónica asintomática (anteriormente denominada forma indeterminada). Esta etapa se define cuando la parasitemia se vuelve indetectable mediante exámenes parasitológicos directos, y se caracteriza por no presentar signos ni síntomas de lesiones viscerales clínicamente detectables por medio de estudios de gabinete, sin embargo existe la producción de anticuerpos los cuales se pueden detectar por medio de pruebas serológicas (http://www.sadi.org.ar/files/ManualChagas_2005.pdf; Rassi et al., 2010).

La fase crónica sintomática, se manifiesta varios años después de la inoculación y generalmente no se presentaron indicios de la fase aguda. Entre un 20-30% de los individuos infectados por *T. cruzi* presentaran sintomatología en algún momento, los dos cuadros clínicos más frecuentes son:

- Afectación miocárdica, que conduce a un deterioro cardiaco progresivo, el cual lleva generalmente en la muerte a lo largo del tiempo (http://www.sadi.org.ar/files/ManualChagas_2005.pdf).
- Dilatación de los órganos tubulares, es decir se presenta megacolon, megaesófago, megaureter, etc. Por tal motivo se le denomina enfermedad «mega» (Rassi et al., 2010; http://www.sadi.org.ar/files/ManualChagas_2005.pdf).

1.5 Genoma de *T. cruzi*

El tamaño del genoma de *T. cruzi* varía de acuerdo a la cepa, se ha encontrado que algunas cepas tienen un genoma más grande que otras. El tamaño del genoma del parásito varía de 80-150 MB. Encontrándose que el grupo genético Tc1 presenta menor tamaño que los demás grupos genéticos (Lewis et al., 2009; Björn, 2011), más adelante se discutirá la variabilidad genética.

En general, no se ha podido obtener un número exacto de los cromosomas de *T. cruzi*, ya que al momento de la mitosis los cromosomas no se condensan. Una de las estrategias por las cuales se quiso determinar el número de cromosomas fue por medio de electroforesis de campo pulsado, a pesar de ello no fue posible obtener un número exacto de cromosomas ya que los cromosomas

homólogos varían mucho en tamaño. La aproximación más exacta del número de cromosomas se obtuvo gracias al proyecto de secuenciación del genoma, en el cual se estimó que el parásito cuenta con 41 pares de cromosomas (Björn, 2011).

A partir de la secuenciación del genoma de la clona CI Brener, fue posible observar que a pesar de la variación del tamaño en los cromosomas homólogos existen regiones conservadas de los genes esenciales, los cuales se encuentran organizados en genes policistrónicos, que se encuentran rodeadas de regiones subteloméricas las cuales se encuentran metiladas (Björn, 2011).

Otra característica del genoma de *T. cruzi* es que tiene gran número de secuencias repetidas, se estima que un 50% del genoma pertenece a este tipo de secuencia. Se ha observado que existen numerosas copias de diversos genes los cuales muchas veces están presentes en tándem y en ocasiones en diferentes cromosomas (Björn, 2011).

1.6 Origen del género *Trypanosoma* y divergencia de *T. cruzi*

De acuerdo a los análisis filogenéticos realizados con secuencias de los genes ribosomales de diferentes tripanosomatidos, el género *Trypanosoma* se diferenció de los demás tripanosomatidos alrededor de 300 millones de años antes de nuestra era. Se estima que en un principio los primeros tripanosomas tenían un ciclo monogénico que posteriormente se adaptó a un ciclo digénico (Stevens et al., 2001).

Se cree que los primeros tripanosomas infectaron a seres acuáticos en un ciclo monogénico, posteriormente se adaptaron a un ciclo digénico en el cual se encontraban involucrados los vertebrados acuáticos y sanguijuelas que funcionaban como vectores. La transición a vectores pertenecientes a los órdenes de hemípteros, dípteros y ortópteros se dió posteriormente, hasta la evolución de la ingesta de sangre por estos insectos y la colonización de la tierra por los vertebrados (Stevens et al., 2001).

La divergencia entre los parásitos salivaríos (clado *T. brucei*) y estercolarios (clado *T. cruzi*) se cree que se dió 100 millones de años antes de nuestra era, aproximadamente cuando el continente Africano se aisló de los demás continentes. Esto se cree ya que el clado de *T. brucei* únicamente es posible encontrarlo en el continente Africano (Stevens et al., 1999).

En el caso del clado de *T. cruzi* afecta principalmente a mamíferos y marsupiales en América, también es posible encontrar a una clase de tripanosoma relacionado genéticamente con *T. cruzi* que infecta canguros en Australia (*Trypanosoma* sp.), lo cual refuerza la idea que *T. cruzi* surgió después de la separación del continente Africano de los continentes Americano y Oceania, por lo

cual se cree que tiene un origen en el nuevo mundo. El único integrante del clado de *T. cruzi* que se encuentra en Europa, es una especie de tripanosoma que infecta murciélagos, los cuales se creen que se infectaron en América e inmigraron a Europa (Stevens et al., 1999).

La evidencia filogenética sugiere que la evolución de *T. brucei* y *T. cruzi* tienen una historia evolutiva muy diferente con relación a la especie humana. En el caso de *T. brucei* compartió un periodo en el cual los primates evolucionaron, los cuales surgieron aproximadamente hace 15 millones de años antes de nuestra era, con la eventual aparición del hombre que surgió aproximadamente 3 millones de años antes de nuestra era. Se cree que el humano tuvo contacto estrecho con el mosquito Tse-Tse, el cual es el vector de *T. brucei*. En contraste *T. cruzi* ha tenido un periodo menor de contacto con los humanos (30000-40000 años), por lo cual los humanos únicamente se sumaron a los hospederos del parásito (Stevens et al., 1999).

1.7 Interrelación entre diversidad genética y patogénesis

Existe una posible relación entre la diversidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* y las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas, patogenicidad y virulencia (Espinoza et al., 1998; López-Olmos et al., 1998; Camargos et al., 2000; Macedo et al., 2004; Zingales et al., 2012). Hoy en día se conoce poco sobre los factores determinantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Hasta hace pocos años prevalecía la idea de que los grupos genéticos no TcI estaría más asociado al ciclo doméstico de transmisión de la infección por el *T. cruzi* y por tanto a la patología de la enfermedad humana (Buscaglia et al., 2003; Manoel-Caetano y Silva, 2007). Aunque esta idea aún prevalezca para las regiones endémicas clásicas del Cono Sur (Brasil y Argentina), resulta cada vez más evidente que, en los países del norte de América del Sur (norte de Brasil, Bolivia, Colombia y Venezuela), Centroamérica, México y el Sur de los Estados Unidos de América, TcI es el principal involucrado en la enfermedad de Chagas en humanos (Macedo et al., 2004).

Más aún, hoy en día se sabe que el principal causante de Enfermedad de Chagas en humanos es el DTU TcI, el cual causa principalmente problemas cardiacos. También se ha encontrado que TcI ha estado asociado a algunos brotes agudos de Chagas oral. En el caso de las DTUs TcII, TcV y TcVI, se han relacionado con cardiopatías y mega síndrome (Zingales et al., 2012).

El mecanismo por el cual las diferentes formas clínicas de la enfermedad se establecen no es claro. Sin duda están involucrados factores asociados al paciente, pero queda cada vez más evidente la existencia de un papel fundamental asociado a aspectos genéticos del parásito. Una posible explicación de la relación entre la forma clínica de la enfermedad y la variabilidad genética del parásito, dependiendo de la cepa de *T. cruzi*, podría deberse al tropismo que presenta para diferentes tejidos (Camargos et al., 2000).

1.8 Variabilidad genética de *T. cruzi*

Se ha encontrado que existe una gran variación en la sintomatología de la Enfermedad de Chagas en las diferentes áreas geográficas. Por ejemplo, la forma gastrointestinal de la Enfermedad de Chagas se observa principalmente en la región central de Brasil y Chile, mientras que en Centroamérica es poco común encontrarla. Las variaciones fisiopatológicas se deben principalmente a factores genéticos del parásito y el hospedero. Las variaciones genéticas de *T. cruzi* determinan el curso de la enfermedad, así como la virulencia y el tropismo a ciertos tejidos (*Macedo et al., 1998; Macedo et al., 2004*).

En 1909 Chagas encontró dimorfismos entre algunos tripomastigotes sanguíneos de diferentes individuos. Posteriormente se analizaron los perfiles isoenzimáticos de *T. cruzi*, encontrando variaciones entre los perfiles isoenzimáticos de las diversas cepas. Estas variaciones permitieron agrupar las cepas en 3 grupos llamados zimodemas (Z1, Z2 y Z3). La principal desventaja de este método es que se necesita una concentración de parásitos del orden de 10^9 - 10^{10} (*Macedo et al., 1998; Macedo et al., 2004*).

La aplicación de técnicas de biología molecular permitió que se analizara el ADN del parásito. Una de las primeras técnicas aplicadas en el análisis del ADN del *T. cruzi* fue la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (por sus siglas en inglés RFLPs), analizando el ADN mitocondrial, en dicha técnica se digiere el ADN del cinetoplasto con diferentes enzimas de restricción y se resolvieron los productos en geles de poliacrilamida. Con la técnica de RFLPs encontraron que existían diferentes perfiles de restricción del cinetoplasto en las diferentes cepas de *T. cruzi*, por tanto se dio una nueva clasificación: Schizodemas. Con dicha técnica fue posible distinguir que en ciertos casos algunas cepas de *T. cruzi* podían pertenecer al mismo zimodema y pertenecer a diferente Schizodema. La desventaja que presenta dicho método es que también necesita una concentración del orden de magnitud de 10^8 - 10^9 de parásitos, lo cual en ocasiones resulta difícil de obtener (*Macedo et al., 1998; Macedo et al., 2004*).

Debido a que es necesario tener una gran concentración de parásitos para realizar los perfiles isoenzimáticos o los perfiles de restricción se aplicó la técnica de RADPs (análisis de secuencias de ADN polimórficas al azar), la cual resulta ser más sensible ya que sólo necesita una concentración de parásitos del orden 10^6 . A pesar de que es un método altamente sensible no cuenta con la misma resolución que puede otorgar un análisis de RFLP (*Macedo et al., 1998*).

El PCR de baja astringencia usando un único primer (LSSP PCR) es una técnica utilizada en el análisis de los polimorfismos encontrados en los fragmentos variables de kADN de

aproximadamente 330 pb. En esta técnica se purifican los amplificadores de la región variable de kADN y posteriormente se someten los amplificadores a una reacción de PCR usando únicamente un solo primer en condiciones de baja astringencia. El primer se une a regiones específicas y no específicas, dando como resultado una mezcla de amplificadores de diferentes tamaños, los cuales se resuelven en geles de acrilamida. Esta técnica se ha utilizado para diferenciar diferentes genotipos de parásitos *T. cruzi* en un mismo individuo (Macedo et al., 2004).

Con la amplificación de la región intergenética de los genes de mini-exón usando 3 oligonucleótidos, dos de los cuales son específicos (TC1 y TC2) y uno común (TCC), fue posible clasificar las cepas en dos linajes: Linaje II o TcI (se obtiene un producto de 350 pb) y Linaje I o TcII (se obtiene un producto de 300 pb). Otro marcador que nos permite clasificar las cepas en linaje I y II es el gen de ARN ribosomal 24 α . Al amplificar el gen de rARN 24 α da como producto un fragmento de 125 pb (TcII) o un fragmento de 110 pb (TcI) (Macedo et al., 1998, Souto et al., 1996) (figura 1.8).

Una de las técnicas más usadas para reconstruir filogenias y clasificar las cepas de *T. cruzi* es por medio de microsatélites. Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva (1 a 6 nucleótidos). La variación en el número de repeticiones crea diferentes patrones de banda los cuales se pueden comparar y usar para realizar análisis filogenéticos (Macedo et al., 1998; Oliveira et al., 1998; Macedo et al., 2001).

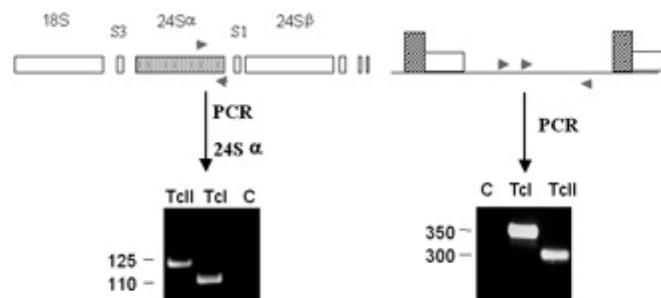


Figura 1.8 Tipificación molecular de aislados de *T. cruzi*. Ensayos de PCR para el gen de rARN 24S α y para el espaciador intergénico del gen de mini-exón permiten dividir los aislados en dos grupos. La PCR para 24S α origina un producto de 110 pb para TcI y de 125 pb para TcII. La PCR para mini-exón origina el producto de 350 pb para TcI y 300 pb para TcII. (http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=2).

En *T. cruzi*, el cistrón ribosomal exhibe una organización singular. Las dos subunidades, la pequeña (SSU) y la grande (LSU) son considerablemente más grandes que las moléculas típicas de rADN de eucariontes. Es particularmente interesante la subunidad grande (LSU) que contienen 2 moléculas de peso de alto peso molecular de ARN (24S α /24S β) y seis moléculas de bajo peso molecular de ARN (S₁-S₆) (Hernández et al., 1990). El cistrón de rADN está constituido por secuencias repetidas en donde la región codificante de SSU y LSU está separadas por dos espaciadores internos transcribibles (ITS's). La ITS1 separa la región codificante de la subunidad 18S y 5.8S rADN

(También llamada S3), y la ITS 2 separa la secuencia 5.8S rADN de la subunidad 24S rADN. Comparando la subunidad 24S rADN de diferentes tripanosomatidos y *T. cruzi* existe gran similitud, a pesar de ello el dominio D7 del gen 24S ribosomal de 100pb localizado en el extremo 3' presenta gran divergencia. Al amplificar el dominio D7 se diferencian 3 grupos genéticos, el linaje 1 o grupo 1 rARN en el cual se amplifica un producto de 125pb, pertenecientes al Zimodema 2; linaje 2 ó grupo 2 rARN que amplifica un producto de 110pb, pertenecientes al Zimodema 1; y el linaje ½ ó grupo ½ rARN que amplifica ambos productos, este grupo comprende cepas pertenecientes al Zimodema 3 (Macedo et al., 2004).

Adicionalmente, cuando se comparan las secuencias de 18S y D7 del gen 24S α rADN se encontró que se pueden clasificar en cuatro ribocladados. El ribocladado 1 son las cepas pertenecientes al Zimodema 1; el ribocladado 2 y 3 comprenden cepas pertenecientes al Zimodema 2; mientras que el ribocladado 4 comprende al Zimodema 3 (Macedo et al., 2004).

Posteriormente, al analizar en conjunto los marcadores 18S, D7 del gen 24S α rADN y mini-exón fue posible clasificar *T. cruzi* en dos linajes: TcI y TcII, este último se subdividió en cinco subgrupos genéticos, denominados TcIIa-TcIIe (Macedo et al., 2004).

Recientemente un grupo de investigadores se reunio para unificar la nomenclatura y criterios de clasificación, en esta convención se reclasificaron los subgrupos del TcII, debido a que al analizar un conjunto de marcadores se ha identificado que son grupos independientes. Se propone que en adelante se mencionan como TcII-TcVI (Tabla 1.2). Esta nueva nomenclatura no toma en cuenta a los subgrupos genéticos de TcI descritos por Herrera y colaboradores en el 2007 (Zingales et al., 2009).

Tabla 1.2 Nueva nomenclatura de *Trypanosoma cruzi*.

Nueva nomenclatura	Abreviación	Equivalencia con la clasificaciones pasadas
<i>T. cruzi I</i>	TcI	<i>T. cruzi I</i> y DTU I
<i>T. cruzi II</i>	TcII	<i>T. cruzi IIb</i> y DTU Iribú
<i>T. cruzi III</i>	TcIII	Z3/ZI, Z3-A, DTU IIc y <i>T. cruzi III</i>
<i>T. cruzi IV</i>	TcIV	Z3, Z3-B y DTU IIa
<i>T. cruzi V</i>	TcV	Z2 Boliviano, rADN ½, clonot 39 y DTU II d
<i>T. cruzi VI</i>	TcVI	Z2 Paraguayo, Zimodema B y DTU IIe, la clona referencia CI Brener pertenece a este DTU

* Tomada de (Zingales et al., 2009).

En un artículo publicado en el año 2009, en el cual se realizó un estudio filogenético utilizando diferentes marcadores como son las secuencias de los genes SSU rADN, EF-1 α , actina, DHFR-TS

(Dihidrofolato reductasa timidilato sintasa) y TR (Tripanotion reductasa) de *T. cruzi*, se ha planteado que la enfermedad de Chagas es causada por dos especies diferentes, es decir Tc I y Tc II (anteriormente denominado TcIIb), las cuales en ocasiones forman híbridos estables (Tomazi et al., 2009), sin embargo esta teoría no es ampliamente reconocida.

1.9 Origen de la variabilidad genética

A pesar de que por mucho tiempo se creyó que la reproducción de *T. cruzi* era absolutamente clonal, se ha demostrado en ciertas condiciones de estrés la existencia de un proceso de intercambio genético parasexual similar al realizado por las levaduras. En el cual existe una fusión de células diploides seguido por recombinación y pérdida de cromosomas al azar, hasta que se obtenga el número original de cromosomas (Gaunt et al., 2003).

La teoría que cuenta con mayor aceptación, postula que el primer evento de hibridación es relativamente antiguo, éste se dió entre los parentales TcI y TcII dando como resultado progenie homocigota, la cual al paso del tiempo divergió en los DTU TcIV y TcIII. El segundo evento de hibridación se dió recientemente, este fue un recruzamiento entre el DTU híbrido TcIII y el parental TcII, el cual dió como resultado híbridos heterocigotos DTU TcV/TcVI (Sturm et al., 2009) (Figura 1.9).

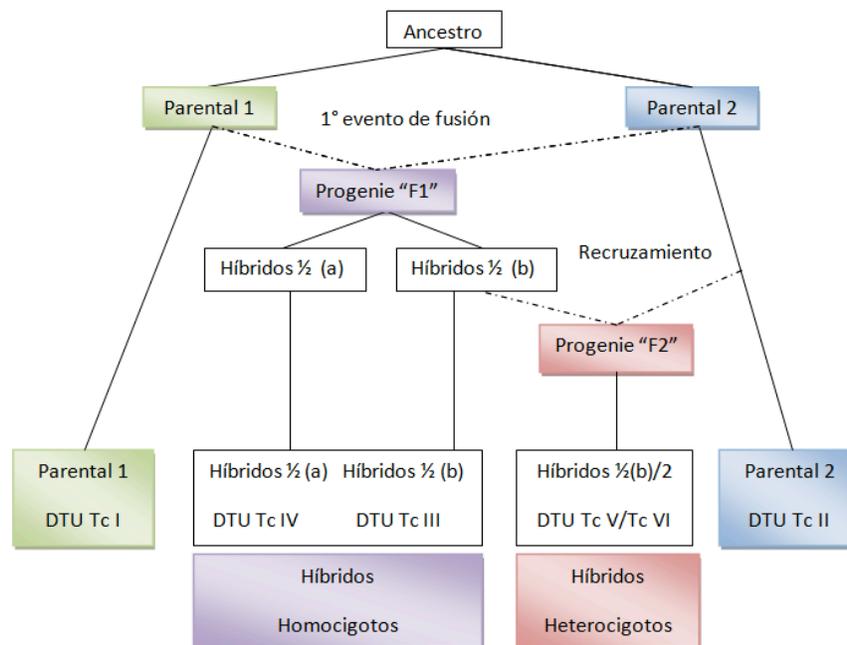


Figura 1.9 Eventos de hibridación que dieron origen a los diversos grupos genéticos de *T. cruzi*. Se cree que en un principio existían únicamente TcI (parental 1) y TcII (parental 2), estos grupos genéticos sufrieron un fenómeno de hibridación, con lo cual se generaron la progenie "F1" TcIV y TcIII. En un segundo evento de hibridación entre TcII (parental 2) y TcIII (progenie "F1") se generaron los híbridos heterocigotos, los cuales corresponden a la progenie "F2" y se denominaron TcV y TcVI (Figura modificada de Sturm et al., 2009).

1.10 Selección clonal en *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* generalmente está dada por un complejo de parásitos multiclonales, es decir la población de parásitos que infecta es altamente heterogénea. Se ha demostrado que en general resulta más compleja la población de *T. cruzi* que se encuentra en un individuo en fase aguda que en un individuo que se encuentre en la fase crónica de la enfermedad. Este fenómeno se debe a que a medida que transcurre el tiempo se seleccionan ciertas subpoblaciones. Generalmente, esta selección está dada por el sistema inmunológico del hospedero (*Macedo et al., 1998; Devera et al., 2003*). Uno de los experimentos que demuestra la selección de subpoblaciones es el realizado por Deane en 1984, en dicho experimento un ratón fue inoculado con dos diferentes cepas de *T. cruzi*, al reaislar al parásito únicamente fue posible encontrar una de las cepas inoculadas (*Devera et al., 2003*).

La selección clonal no solo se da *in vivo*, también ocurre al cultivar al parásito *in vitro*, se ha demostrado que a lo largo del tiempo el parásito pierde virulencia. Algunas poblaciones de parásitos se adaptan más rápido a las condiciones de cultivo *in vitro*. De tal forma que al paso del tiempo se modifican el perfil genético de la población. Las clonas que tienen menor tiempo de duplicación en el medio de cultivo son las que prevalecen y se seleccionan (*Devera et al., 2003*).

1.11 Distribución epidemiológica de los variantes genéticos de *T. cruzi*

El grupo genético que causa mayor número de casos de la enfermedad de Chagas es el DTU TcI, distribuyéndose a lo largo de toda Latinoamérica. En el Norte, Centro de Latinoamérica y Norte de Sudamérica, causa el mayor número de infecciones humanas, mientras que en Estados Unidos, Norte de México y Sur de Sudamérica está implicado principalmente en las infecciones en el ciclo selvático (**Figura 1.10**)(*Buscaglia et al., 2003; Devera et al., 2003; Llewellyn et al., 2009; Zingales et al., 2012*).

En el caso de TcII, TcV y TcVI, están implicados principalmente en infecciones en el ciclo doméstico en la región Centro y Sur de Sudamérica. En el caso de TcIII y TcIV principalmente se encuentran relacionados con el ciclo selvático. TcIII se distribuye principalmente en Brasil y alrededores, es decir Argentina principalmente en la región del Chaco en Argentina y Venezuela. En el caso de TcIV se encuentra distribuido en Brasil, Venezuela y Argentina (exceptuando en la región del Chaco). En el caso de Venezuela, TcIII y TcIV representan la segunda causa de mal de Chagas en humanos (*Zingales et al., 2012*).

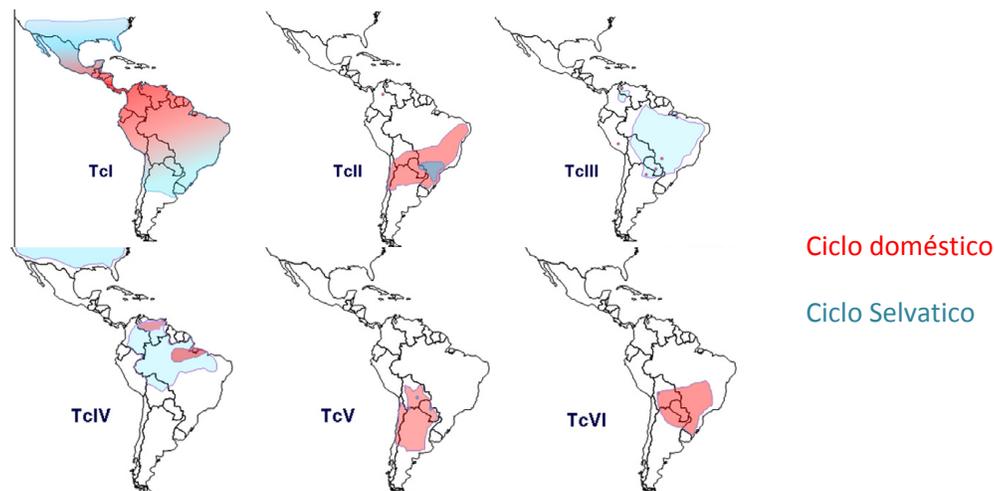


Figura 1.10 Distribución epidemiológica de los diversos DTUs de *T. cruzi* en Latinoamérica. En México, Centroamérica y el Norte de Sudamérica predomina el DTU TcI en el ciclo doméstico mientras que al sur de Sudamérica las infecciones en el ciclo doméstico están dadas por TcII, TcV y TcVI (Tomado de Zingales *et al.*, 2012).

1.12.0 Variabilidad Genética de *T. cruzi* I

A pesar de que Tc I está agrupado en un solo clado hay evidencia de heterogeneidad genética en este grupo, identificándose diferentes grupos genéticos, de acuerdo a la herramienta de estudio.

1.12.1 Análisis por medio de microsatélites

Anteriormente se creía que TcI era altamente homogéneo, esto se debe a que anteriormente los métodos usados no eran suficientemente sensibles y el número de individuos analizados no era suficientemente grande. Hoy en día se ha determinado que Tc I es el DTU que presenta mayor variabilidad genética, esto se debe a su alta dispersión geográfica y antigüedad (Zingales *et al.*, 2012). Recientes estudios realizados con técnicas de biología molecular, han demostrado que dicho DTU se puede subdividir en diferentes grupos genéticos. El primer estudio que demostró que Tc I (grupo 2 de rRNA) no era tan homogéneo como se creía, fue el realizado por Macedo en el 2001, en dicho estudio se pudieron diferenciar 2 grupos genéticos distinguibles por medio del análisis con 7 pares de microsatélites, también fue posible observar que uno de los grupos de TcI era más cercano genéticamente al grupo 1/2 de rRNA, las cuales son de origen humano, mientras que las cepas de origen selvático se agrupan en una sola rama (Macedo *et al.*, 2001) (**Figura 1.11**).

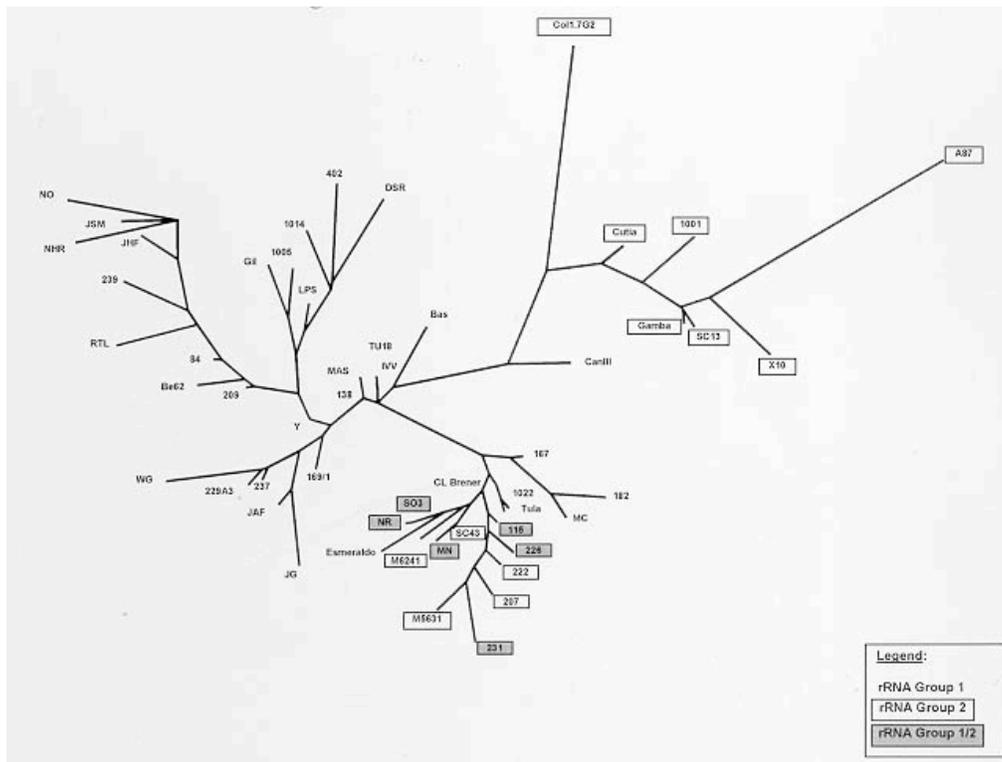


Figura 1.11 El grupo TcI (2 de rRNA) se divide en 2 grupos altamente distinguibles. Por medio de la técnica de microsatélites fue posible observar que TcI se divide en dos grupos y uno de ellos está más relacionados con el grupo 1/2 de rARN (Macedo et al., 2001).

En el año 2009, se realizó un estudio de 135 cepas Tc I de diversas regiones geográficas de América (sin incluir cepas mexicanas). Dicho análisis se realizó con un panel de 48 microsatélites los cuales mostraban polimorfismos en cepas Tc I. En este estudio fue posible observar agrupamiento entre cepas de la misma región geográfica, es decir en general las cepas de cada país se agrupaban en un solo grupo. Otro fenómeno que fue posible distinguir, fue que las cepas venezolanas se agrupaban en dos grupos genéticos diferentes de acuerdo al tipo de ciclo al cual pertenecían, es decir se agrupaban en una rama las cepas de ciclo doméstico y en otra rama las cepas de ciclo selvático, este fenómeno también se observa con los aislados de la región Andina, los aislados se agrupan por origen geográfico y biológico (Llewellyn et al., 2009) (**Figura 1.12**).

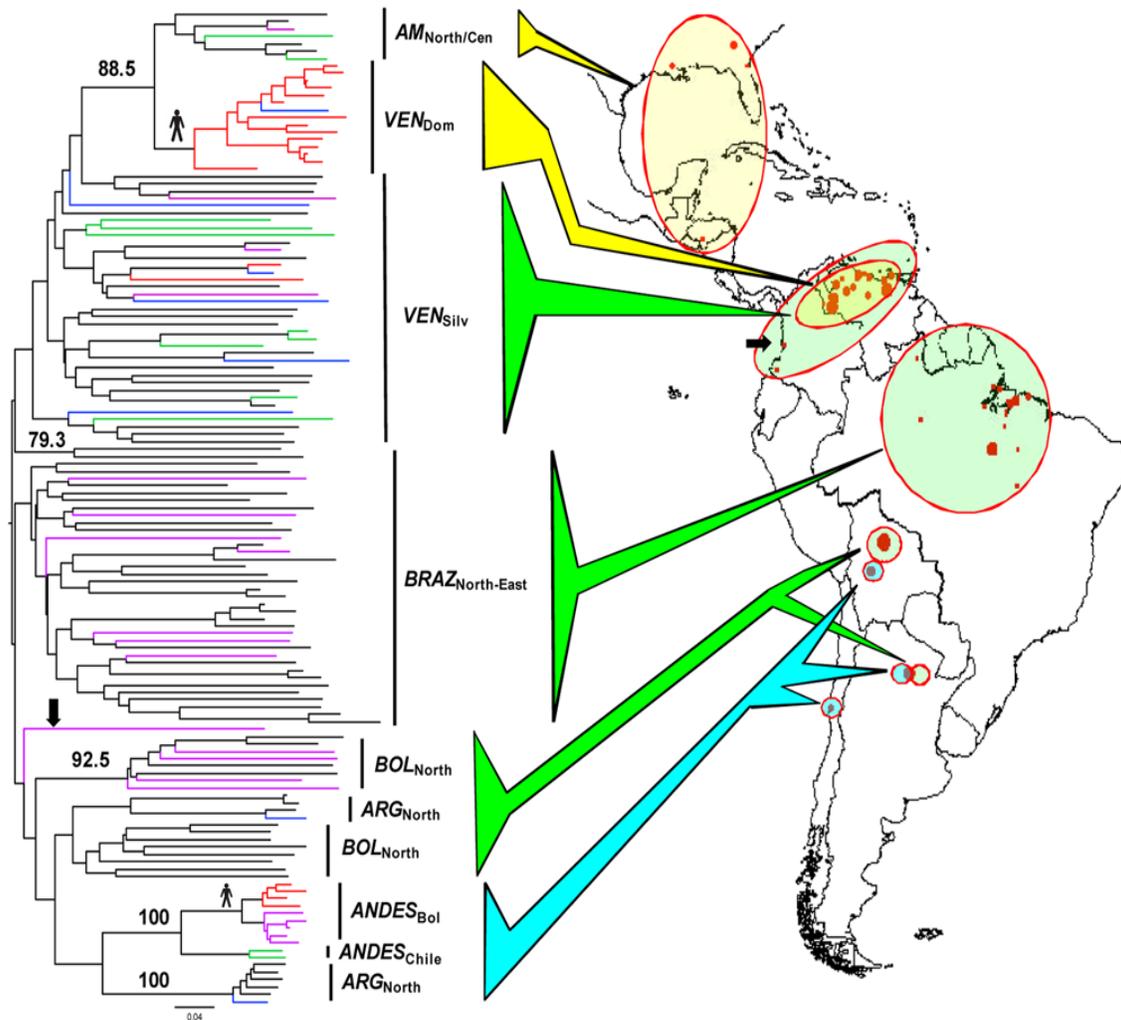


Figura 1.12 Árbol desenraizado que muestra la estructura poblacional de *T. cruzi* Tc I en América. El método para la construcción del árbol fue Neighborjoining D_{AS} analizando los resultados de 48 microsatélites. El color de las ramas representa el origen de los aislados, en el caso de las ramas negras representan aislados de *Didelphis*, púrpura reservorios mamíferos selváticos, verde triatomíneos selváticos, rojos aislados humanos y azules triatomíneos domésticos. Es posible observar cluster por región geográfica y en el caso de los aislados Venezolanos se observa una agrupación de acuerdo al ciclo biológico que pertenecen, al igual que los aislados de los andes, los cuales se agrupan por país origen biológico (Llewellyn et al., 2009).

1.12.2 Análisis por medio de LSSP PCR

Por medio de la técnica PCR de baja astringencia usando un único primer específico (por sus siglas en inglés LSSP PCR) amplificando la región variable del cinetoplasto, se pudo observar una alta diversidad genética entre cepas TcI provenientes de diferentes regiones de Colombia y diversas fuentes (algunas cepas provenían de vector, de humano o de reservorio) encontrándose que se agrupaban por región geográfica (Salazar et al., 2006) (Figura 1.13).

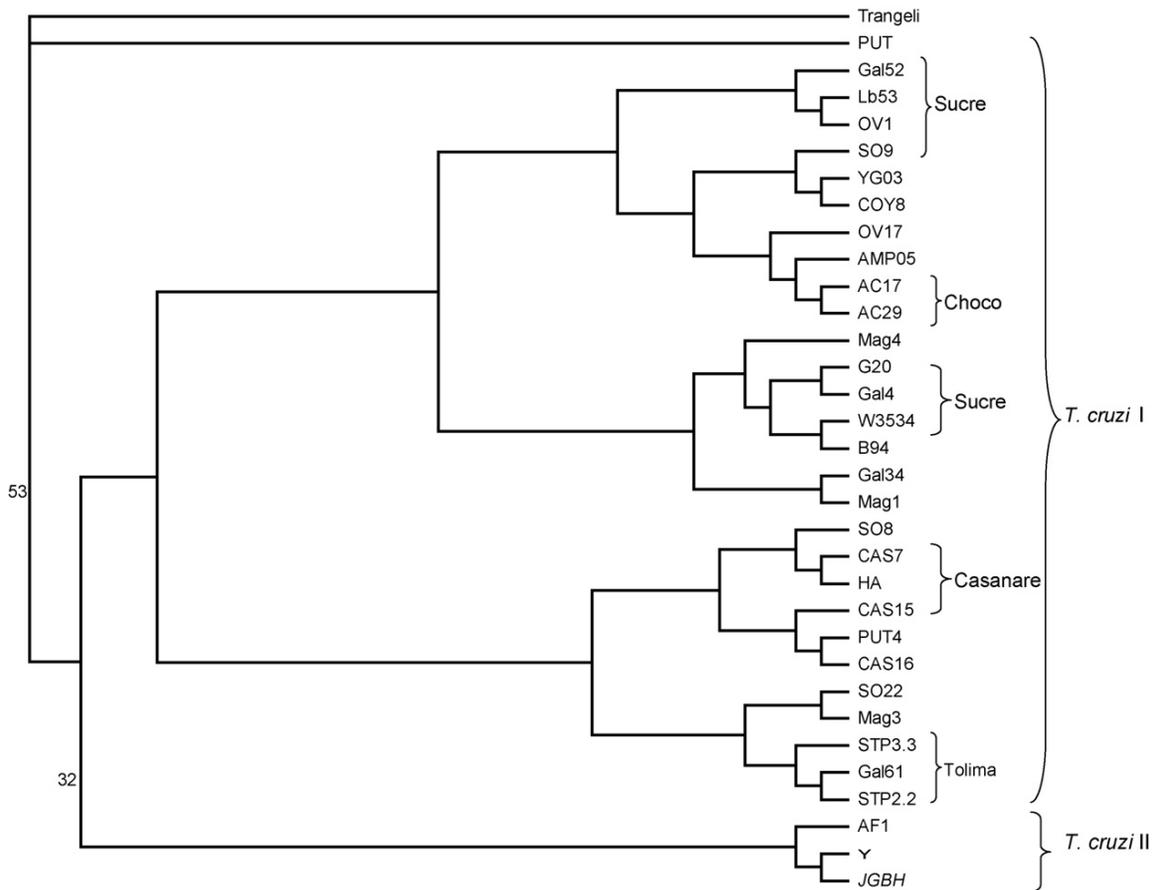


Figura 1.13 Árbol filogenético construido con diversas cepas de *T. cruzi* Sudamericanas. El árbol se construyó usando el método UPGMA. En el árbol es posible observar cómo se agrupan las cepas por región geográfica (Salazar et al., 2006).

1.12.3 Análisis gen mini-exón

En el año 2007 se describieron 4 haplotipos en cepas colombianas, gracias a la secuenciación del gen de mini-exón (Herrera et al., 2007) (Figura 1.14). En estudios posteriores reportaron primers específicos, los cuales permitieron la identificación de dichos haplotipos por medio de PCR (Falla et al., 2009).

1	CGC	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
	FVC	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
	SN6C	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
2	FChC	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	Td11C	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	JLC	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	Mg10C	TCCTGCAGGCACAC	GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
3	X380C	TCCTGCAGGCACAC	GCACACGTGTGTGTGTGTATATATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	EFC	TCCTGCAGGCACAC	GCACACGTGTGTGTGTGTATATATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	60
4	Dm28colC	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	Dm7C	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	FALC	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	JD18	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51

Figura 1.14 Alineamiento de fragmento del gen mini-exón. La región que se limita en el recuadro es la región polimórfica que determina los cuatro diferentes haplotipos propuestos (Herrera et al., 2007).

En el 2010 se publicó un estudio en el cual se analizaba nuevamente el gen de mini-exón en el cual se incluían cepas y clonas de diez diferentes países de América, las cuales provenían de diferentes orígenes biológicos, cabe destacar que en este estudio se incluyendo 3 cepas mexicanas (HD/Duran, PG/Gamma, TR/Triatoma), las cuales son de origen vectorial y no se sabe de qué localidad provienen. En este análisis fue posible describir 5 grupos genéticos, cuatro grupos los cuales se habían descrito anteriormente como “haplotipos” TcI a-d, hoy en día llamados grupos genéticos Tc I a-d (*Falla et al., 2007; Herrera et al., 2009*), y un nuevo grupo genético denominado Tc le, en el caso de las cepas mexicanas, estas pertenecen al grupo genético Tc Ia. El nuevo grupo genético, Tc le, esta constituido en su mayoría por aislados de Chile (*Cura et al., 2010*) (**Figura 1.15**). Es preciso aclarar que lo que anteriormente se denominaban haplotipos, no los son en realidad, son grupos genéticos ya que un haplotipo es un grupo genético que tiene los mismos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), y en este caso se muestra que estos grupos genéticos no tienen los mismos SNPs, por tanto son únicamente grupos genéticos (*Zingales et al., 2012*).

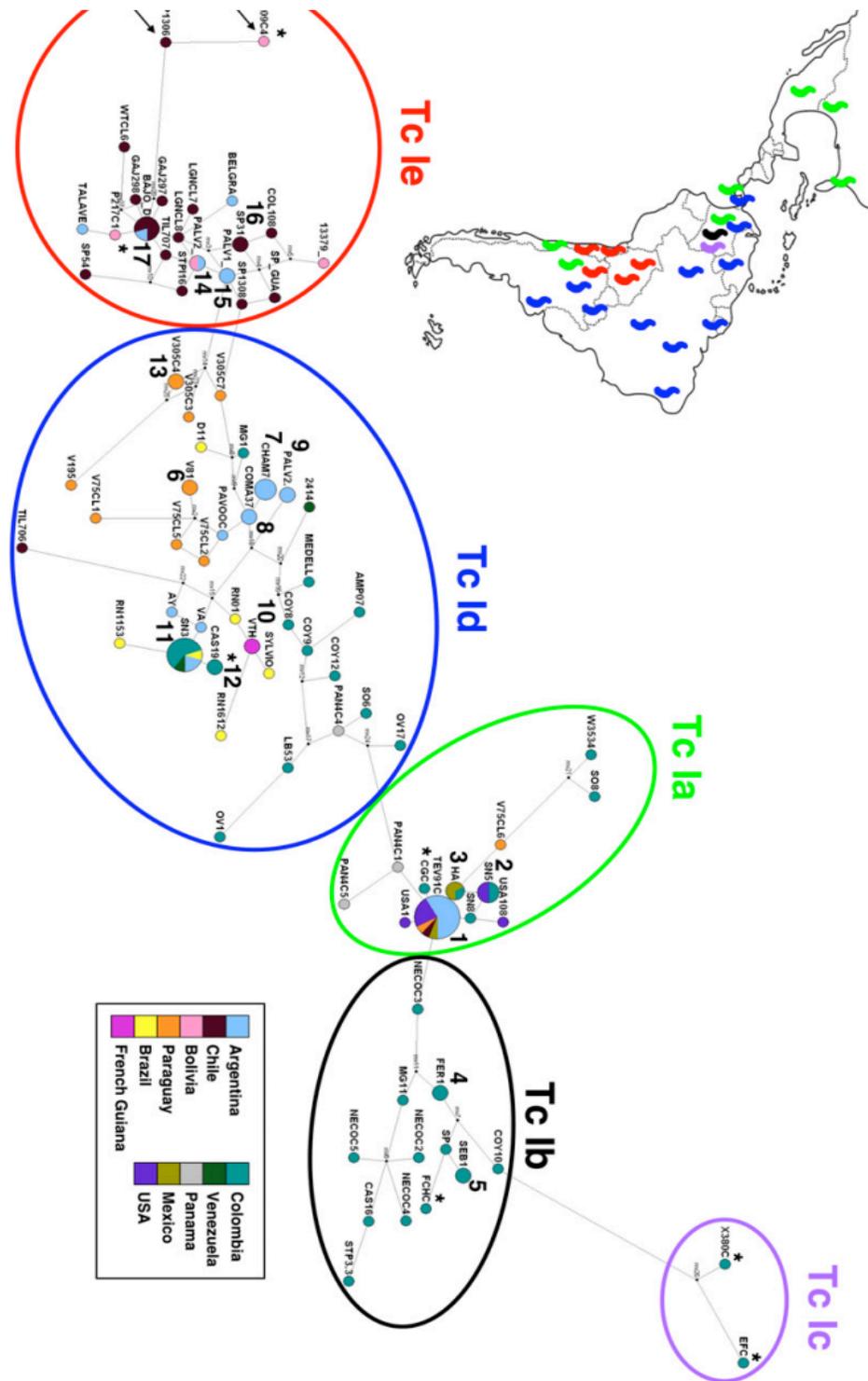


Figura 1.15 Red Median Joining de *Trypanosoma cruzi* I. En la siguiente red de haplotipos se analizaron 105 cepas de *T. cruzi* I provenientes de diversas regiones de América. Es posible observar los cuatro grupos genéticos, los cuales pertenecen a los haplotipos descritos por Herrera y colaboradores en el 2007 (Tc Ia, Tc Ib Tc Ic y Tc Id) y el recién descubierto “haplotipo” Tc Ie, el cual predomina en las cepas chilenas (Cura et al., 2010).

En 2011, al analizar diferentes aislados de la región del Chaco, la región que cuenta con mayor prevalencia en Argentina, se reportó la existencia de cuatro diferentes grupos genéticos, de los cuales dos correspondían a los grupos genéticos Tc Ia y Tc Ib, describiéndose dos grupos genéticos

nuevos los cuales fueron nombrados grupo Chaco 3 y Chaco 4 (**Figura 1.16**) (*Tomasino et al., 2011*).

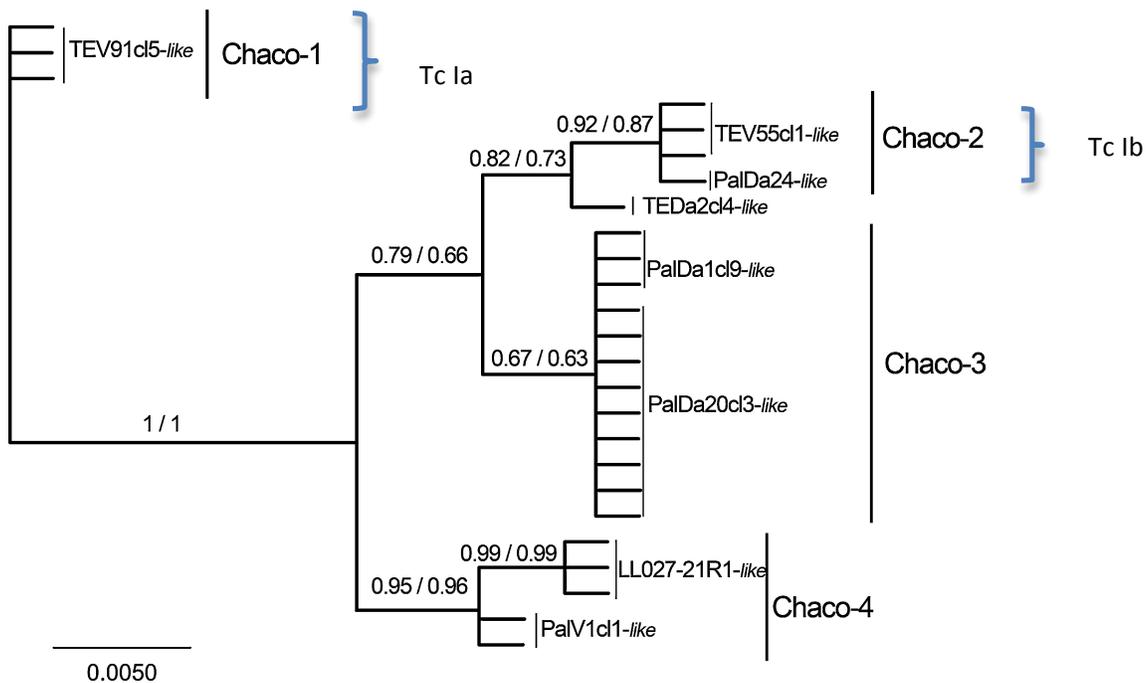


Figura 1.16 Árbol filogenético analizando el gen de mini-exón de aislados *Tc I* provenientes de la región del Chaco. Es posible observar que en la región del Chaco circulan cuatro diferentes grupos genéticos, encontrándose que el grupo Chaco 3 y Chaco 4 son grupos genéticos los cuales no se habían descrito anteriormente (*Tomasino et al., 2011*).

1.12.4 Análisis gen citocromo B mitocondrial

De acuerdo a un estudio publicado en el año 2008, al secuenciar un fragmento de 550 pb del gen de *citocromo b* mitocondrial fue posible el descubrimiento de dos subgrupos genéticos de *Tc I*, estos grupos genéticos se denominaron, *Tc Ia* y *Tc Ib* de citocromo B (*Spotorno et al., 2008*) (**Figura 1.17**).

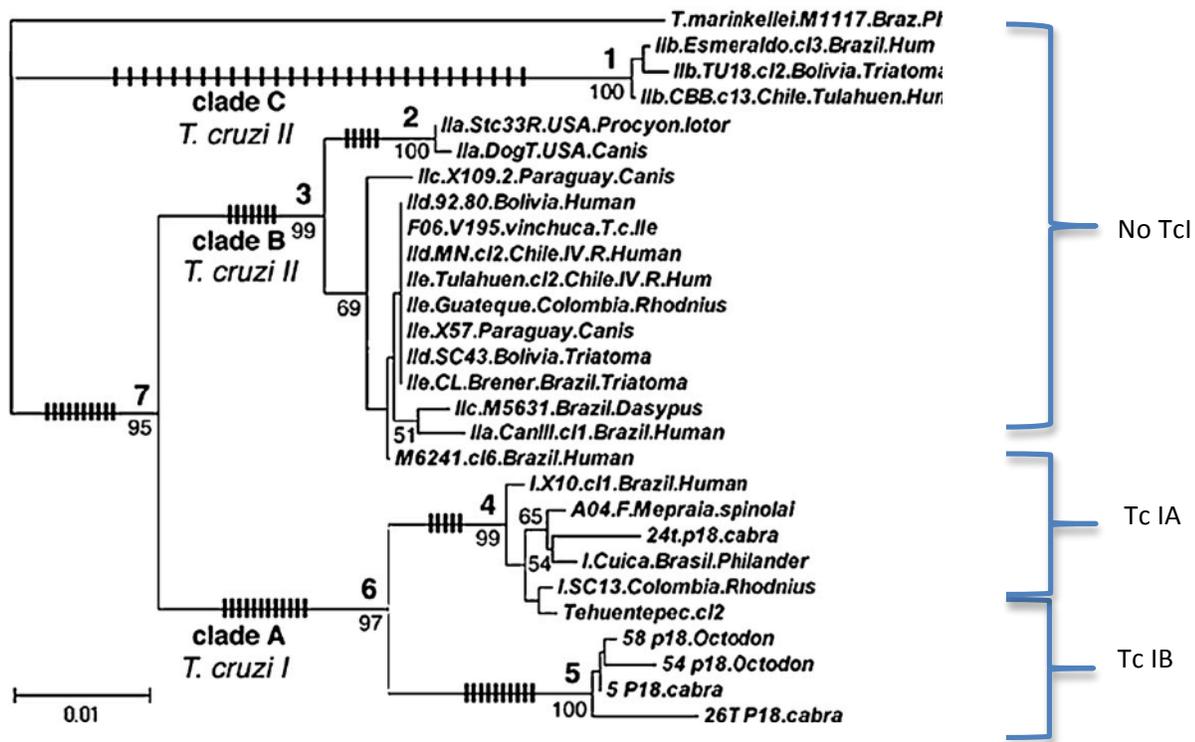


Figura 1.17 Filograma de 28 secuencias de Citocromo B de 28 cepas de *T. cruzi* usando el método *Maximum likelihood*. En el árbol es posible observar la existencia de dos subgrupos de TcI usando como marcador la secuencia de citocromo B, lo cual nos indica la existencia de diversidad genética en el DTU TcI (*Spotorno et al., 2008*).

Recientemente, en el 2011, se publicó un estudio de clonas colombianas en el que también se analizaba el gen *mitocondrial de citocromo B*, con el cual encontraron cuatro diferentes grupos genéticos, los cuales estaban asociados a su origen biológico (*Ramírez et al., 2011*) (**Figura 1.18**).

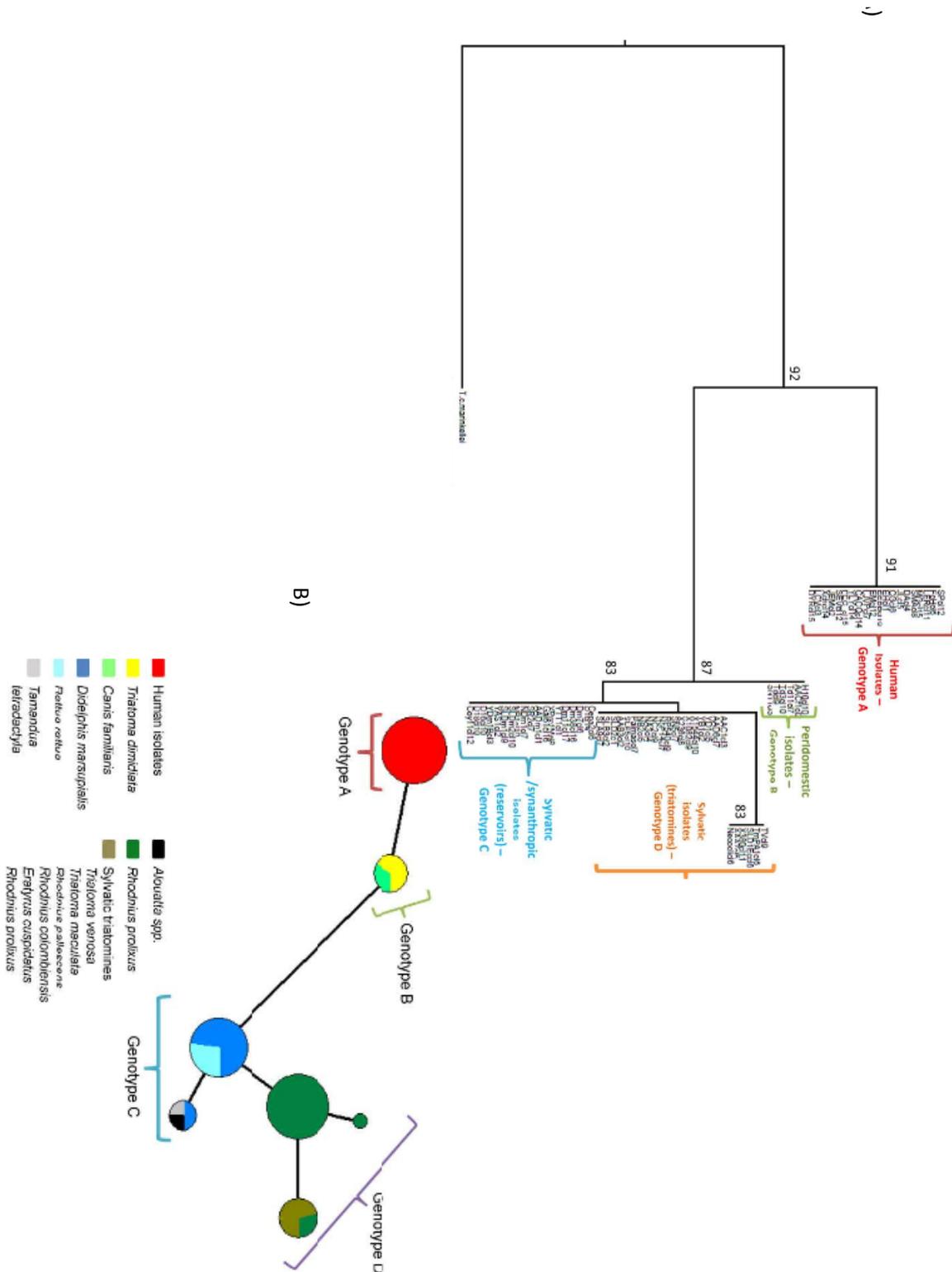


Figura 1.18 Análisis de clonas colombianas mediante un análisis de Maximum Likelihood y una red Median Joining. Mediante este tipo de análisis fue posible identificar 4 diferentes grupos genéticos, los cuales se encuentran asociados a su origen biológico. A) Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Maximum Likelihood B) Red MJ, de acuerdo al origen biológico en la red MJ se coloreo los diferentes nodos de la red (Ramirez et al., 2011).

1.13 Variabilidad genética de *T. cruzi* I en México

Los primeros estudios de la diversidad genética de *T. cruzi* en la República Mexicana se realizaron entre los años 80-90s. En el primero que se realizó, se analizaron algunos aislados de México mediante la técnica de perfiles isoenzimáticos, en este estudio se observó gran homogeneidad en los aislados mexicanos (*Galván et al., 1983*). Posteriormente, mediante el análisis de RFLP's dados por la enzima *HindIII*, de ADN asociados a los espaciadores del gen de ARN ribosomal, fue posible determinar que existían diferentes patrones de bandeos, los cuales estaban asociados al origen geográfico de los aislados, Es decir en una rama se agrupaban aislados de la Península de Yucatán y en otra se agrupaban los aislados del Centro y Norte de la República Mexicana (*Zavala-Castro et al., 1992*) (**Figura 1.19**).

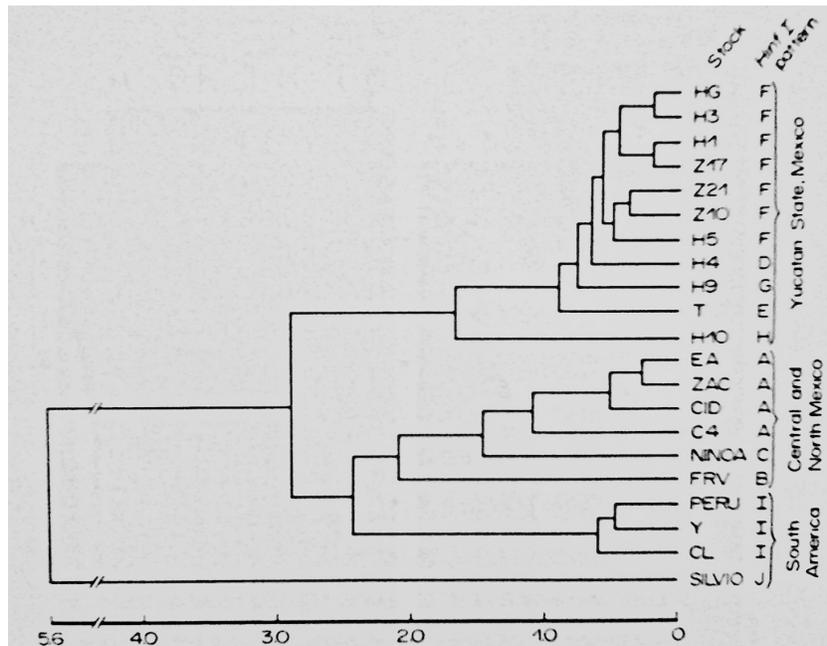


Figura 1.19 Dendrograma derivado del patrón de bandeo obtenido a partir de RFLPs usando la enzima *HindIII*. Se puede distinguir 2 diferentes grupos genéticos entre las cepas mexicanas, uno asociado a las cepas de Yucatán y otro asociado a las cepas del Centro y Norte de México (*Zavala-Castro et al., 1992*).

Posteriormente en 1998, al analizar cepas mexicanas por medio de los perfiles isoenzimáticos de 11 enzimas y 16 locis, fue posible corroborar los resultados anteriormente descritos en 1992, en general las cepas mexicanas se agrupaban de acuerdo a su origen geográfico (*López-Olmos et al., 1998*) (**Figura 1.20**).

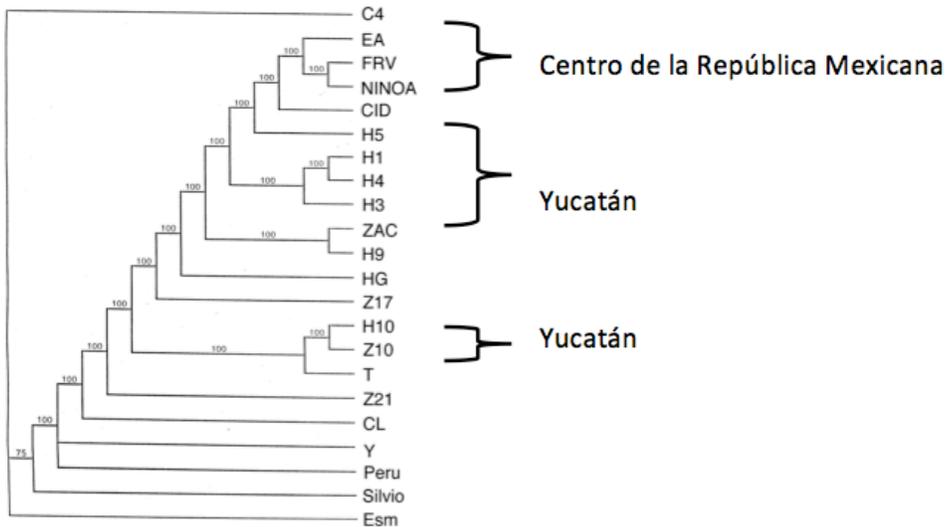


Figura 1.20 Dendrograma obtenido a partir de los perfiles isoenzimático. Es posible observar que la mayor parte de las cepas mexicanas se agrupan en una sola rama, excepto C4. También es posible observar que existe una tendencia a la agrupación entre cepas de la misma región geográfica.

En el año 2002 se encontró que el grupo genético predominante en México es TcI. En este mismo estudio se reportó que al amplificar ADN polimórfico al azar (RAPD), las cepas mexicanas son altamente homogéneas (Bosseno et al., 2002) (Figura 1.21).

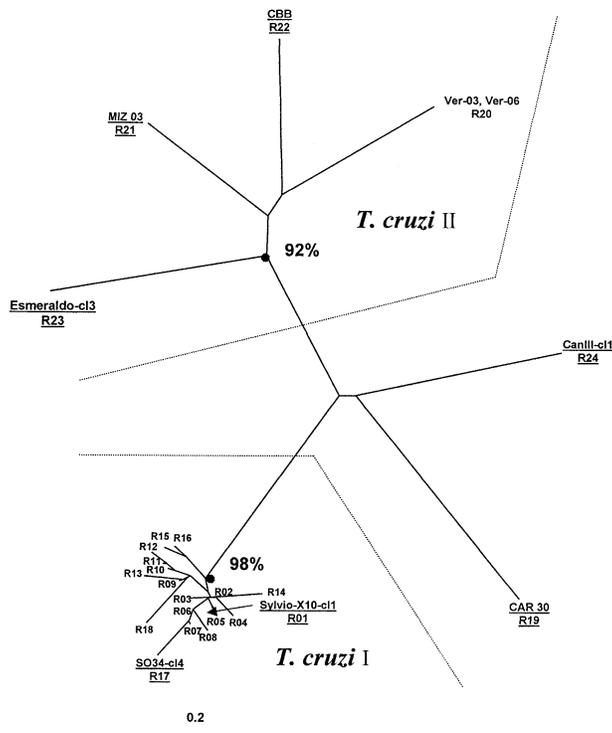


Figura 1.21 Análisis de 56 aislados de *T. cruzi* mexicanos utilizando 24 diferentes RADPs. En el árbol podemos distinguir que la mayor parte de los aislados mexicanos se agrupan con la clona Silvio X-10, la cual pertenece al grupo genético TcI, además de que la distancia genética entre los aislados TcI es muy pequeña (Bosseno et al., 2002).

Al analizar las secuencias de mini-exón de aislados mexicanos, se observó una diferenciación entre los aislados mexicanos y aislados de otros países, ya que fue posible distinguir un clúster que contenía las cepas mexicanas (O'Connor et al., 2007) (Figura 1.22).

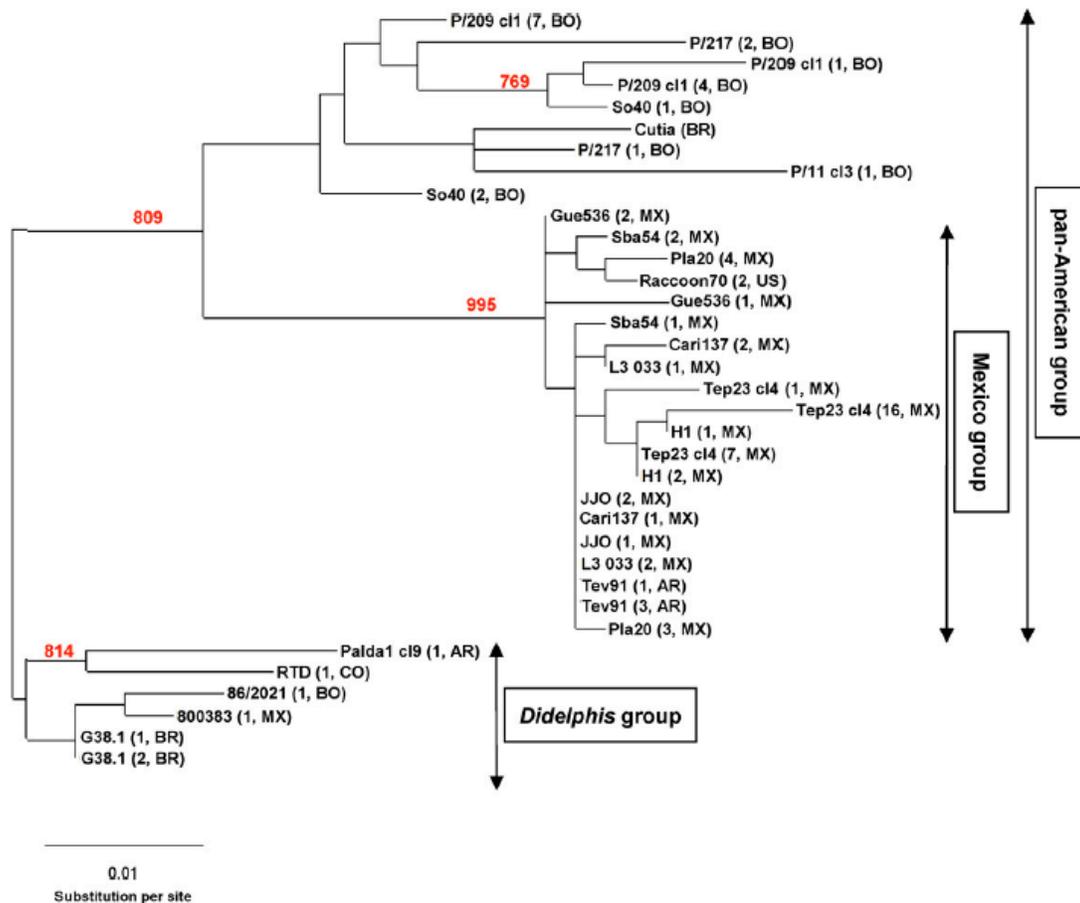


Figura 1.22 Árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood a partir de secuencias de mini-exón de clonas *Tc I*. En el árbol es posible observar que las cepas mexicanas se agrupan en una sola rama, lo cual nos indica que posiblemente las cepas mexicanas se diferencien genéticamente de las cepas de otros países (O'Connor et al., 2007).

Al analizar cepas mexicanas en su mayoría aisladas de humanos, por medio de siete microsatélites se encontró que las cepas presentaban gran homogeneidad, a pesar de ello fue posible distinguir que existen dos cepas (JJO y Mor03) las cuales presentan mayor distancia genética al compararlas con las demás cepas mexicanas (Martínez I., Noguera B., Espinoza B; en prensa).

2.0 Planteamiento del problema

En México existen pocos estudios en los cuales se haya caracterizado genéticamente al parásito *T. cruzi*. Los trabajos que se han publicado indican que el grupo genético predominante es TcI (*López-Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002; O`Cannor et al., 2007; datos no publicados del laboratorio*). Hasta el momento los resultados obtenidos son ambiguos, ya que por una parte se ha encontrado que existe cierta heterogeneidad (*Zavala-Castro et al., 1993, López-Olmos et al., 1998*), mientras que en otros estudios más recientes se ha encontrado homogeneidad (*Galván et al., 1983; Bosseno et al., 2002, datos del laboratorio no publicados*). Por estas razones, las conclusiones de los estudios publicados son bastante limitadas ya que los grupos de estudio son de tamaño reducido y las técnicas empleadas no son lo suficientemente sensibles para diferenciar genéticamente subpoblaciones de los parásitos, aunado a que en estos estudios únicamente se han analizado un solo marcador molecular, lo cual en ocasiones no es suficiente para realizar la inferencia filogenética. Por tal motivo en el presente trabajo se realizó una caracterización genética, con técnicas que cuentan con mayor sensibilidad como son: microsatélites, secuenciación de SL mini-exón y citocromo B. Con este estudio se planteó obtener mayor información de la diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* mexicanas y también encontrar la relación genética entre las cepas mexicanas pertenecientes al DTU TcI con cepas y clones TcI de diferentes países.

3.0 Hipótesis

Al ampliar el grupo de estudio y aplicar tres técnicas de análisis genético a las cepas mexicanas, las cuales cuentan con mayor sensibilidad a las aplicadas en el pasado, será posible dilucidar la diversidad genética en las cepas mexicanas TcI, así como su relación con otros aislados de Latinoamérica.

4.0 Objetivo

Realizar un estudio de la diversidad genética de cepas de *Trypanosoma cruzi* mexicanas de diferentes orígenes geográficos y biológicos, utilizando: microsatélites, secuenciación del gen SL mini-exón y fragmento de citocromo B mitocondrial.

5.0 Metodología

5.1.0 Análisis por medio de microsatélites

5.1.1 Selección de cepas

En la primera etapa del proyecto se seleccionaron 47 cepas de *T. cruzi* mexicanas de diversos orígenes geográficos y biológicos del cepario del laboratorio de investigación de *T. cruzi* del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), tutelado por la Doctora Bertha Espinoza. Entre las cepas seleccionadas se encontraban cepas de los estados: Colima, Guanajuato, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. Los orígenes biológicos de los aislados son diversos: Humano, Reservorio o de vector (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Origen geográfico y biológico de cepas analizadas por medio de microsatélites

Clave	Cepa	Estado	Localidad	Origen biológico
TPIR/MX/1999/Cari 006	Cari 6	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>T. picturata</i>
T000/MX/1999/Cari 009	Cari 9	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/1999/Cari 011	Cari 11	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/1999/Cari 043	Cari 43	Nayarit	Carrillo Puerto	C. Phyllosoma
T000/MX/1999/Cari 044	Cari 44	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>T. picturata</i>
T000/MX/0000/Cari 102	Cari 102	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/0000/Cari 103	Cari 103	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/0000/Cari 105	Cari 105	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/0000/Cari 111	Cari 111	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>
TINF/BR/1963/CL-Brener	Cl Brener	Brasil		T. infestan
Col 18: TLON/MX/1998/Col 18	Col 1	Colima	-----	-----
TPAP/MX/1998/Col 07	* Col 7	Colima	Nogueras	T. pallidipennis
TMAZ/MX/2008/Copgro	CopGro	Guerrero	San Francisco	T. mazzotti
MHOM/MX/2007/Cristi	CRISTI	San Luis Potosí	Tamazunchale	Humano
TPHY/MX/1999/Cux 43	Cux 43	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 46	Cux 46	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 50	Cux 50	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 53	Cux 53	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 56	Cux 56	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 58	Cux 58	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis
TLON/MX/1999/Cux 60	Cux 60	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
TLON/MX/1999/Cux 66	Cux 66	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>
MHOM/MX/0000/FRV	FRV	Oaxaca	-----	Humano
Guaymas: TPIR/MX/0000/Guaymas	Guaymas	Sinaloa	Guaymas	-----
MHOM/MX/0000/H002	H 3	Yucatán	-----	Humano
MHOM/MX/0000/H005	H 5	Yucatán	-----	Humano
MHOM/MX/0000/H009	H 9	Yucatán	-----	Humano
MHOM/MX/0000/H010	H 10	Yucatán	-----	Humano
MHOM/MX/0000/HG	HG	Yucatán	-----	Humano
MHOM/MX/2000/INC-6	Inc 6	Guanajuato	San Pedro Tututepec	Humano
TPAP/MX/2010/IRA-1	Ira 1	Guanajuato	Irapuato	Vector (especie no identificada)
MHOM/MX/0000/JBE	JBE	Jalisco	-----	Humano

MHOM/MX/0000/JFA	JFA	Jalisco	-----	Humano
MHOM/MX/0000/JJO	* JJO	Jalisco	-----	Humano
MHOM/MX/1995/MOR002	Mor 2	Morelos	Temixco	Humano
MHOM/MX/1995/MOR003	* Mor 3	Morelos	Temixco	Humano
MHOM/MX/1995/MOR007	Mor 7	Morelos	Xochitepec	Humano
MDID/MX/1997/MOR011	Mor 11	Morelos	Temixco	<i>D. virginiana</i>
T000/MX/0000/Nay 01	Nay 1	Nayarit	Puga	<i>C. Phyllosoma</i>
TLON/MX/0000/Nay 16	Nay16	Nayarit	Puga	<i>T. longipennis</i>
MHOM/MX/1994/Ninoa	* Ninoa	Oaxaca	-----	Humano
TBAR/MX/0000/Queretaro	* Qro	Queretaro	-----	Vector (especie no identificada)
TBAR/MX/1998/Sba 56	Sba 56	Oaxaca	San Bartolo de Coyotepec	<i>T. barberi</i>
TBAR/MX/1998/Sba 58	Sba 58	Oaxaca	San Bartolo de Coyotepec	<i>T. barberi</i>
TMAZ/MX/2006/Tecgro 002	TecGro 2	Guerrero	-----	<i>T. mazzotti</i>
TMAZ/MX/2006/Tecgro 004	TecGro 4	Guerrero	-----	<i>T. mazzotti</i>
T000/MX/1998/Tep107	Tep 107	Jalisco	Cruzero de San Martin	<i>C. Phyllosoma</i>
T000/MX/1998/Tep 140	Tep140	Jalisco	Tepehuaje	<i>C. Phyllosoma</i>
Tpap/mx/1991/Tequesquitengo	Tequesquitengo	Morelos	Tequesquitengo	<i>T. pallidipennis</i>
MDID/MX/1991/VER001	Ver 1	Veracruz	-----	<i>D. virginiana</i>
MDID/MX/1991/VER004	Ver 4	Veracruz	-----	<i>D. marsupialis</i>
MDID/MX/1989/VER 005	Ver 5	Veracruz	-----	<i>D. oposum</i>
MDID/MX/1991/VER006	* Ver 6	Veracruz	-----	
TDIM/mx/2003/Xalapa	Xalapa	Veracruz	Xalapa	-----

En negritas se muestran las cepas representativas.
*Cepas analizadas únicamente con microsatélite SCLE 1-2.

5.1.2 Descongelación de cepas

Las cepas se encontraban congeladas en medio LIT/glicerol 7.5 % en Nitrógeno líquido. Para descongelar los parásitos, fue necesario descongelar el criovial mediante baño María a 37°C, una vez descongelada la cepa se toman 500 µl y se colocan en condiciones de asepsia en medio LIT suplementado con SFB al 10% y con hemina 25 µg/ml. Posteriormente se incuban a 37°C por una hora y después de esta primera incubación se transfiere a 28°C hasta que el cultivo alcance la fase log de crecimiento.

5.1.3 Obtención de parásitos de 57 cepas diferentes

Se inocularon 20 millones de parásitos en 10 ml de medio LIT suplementado con suero fetal bovino (10 %) y hemina (25 µg/ml). El cultivo se dejó crecer hasta que alcanzara la fase exponencial de crecimiento, la cual tardó de 3 a 4 días; en esta fase alcanzó una concentración de 30 a 50 millones de parásitos/ml. Este cultivo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, con lo cual se sedimentaron los parásitos y se decantó el medio de cultivo. Posteriormente, se realizó un lavado, para ello se re suspendió el botón de parásitos en 1 ml de amortiguador de fosfatos salinos (PBS) estéril, se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y se decantó el amortiguador de PBS. El botón de parásitos se congelaron a -20°C hasta su uso (López-Olmos et al., 1998).

5.1.4 Extracción ADN de *T. cruzi*

El botón de parásitos se resuspendió en 2 ml de amortiguador de lisis (NaCl 80 mM, EDTA 45 mM pH 8 y SDS 1 %) y agitó gentilmente, hasta que se obtuvo una solución viscosa. El lisado resultante se dividió en partes iguales, a las cuales se les adiciono proteinasa K a una concentración final de 0.1 mg/ml, y se incubaron a 37° C durante 16 horas. Pasado el tiempo de incubación con proteinasa K, se adicionó un volumen igual de Fenol saturado, se agitó gentilmente hasta formar una emulsión uniforme la cual se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm. Al finalizar la centrifugación, la emulsión se separó en dos fases, la fase acuosa se separó y se le agrego un volumen de una mezcla de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamilico (25:24:1), la cual se agitó gentilmente hasta formar de nueva cuenta una emulsión uniforme que se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm. Al finalizar centrifugación, se separó la fase acuosa de la fase orgánica a la cual se le añadió dos volúmenes de etanol absoluto frio. La mezcla resultante se agito gentilmente y se incubó durante una hora a -20°C. Pasando el tiempo de incubación la solución se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar la centrifugación se decantó todo el líquido dejando únicamente el botón de ADN, el cual se dejó secar al aire. Ya completamente seco el botón de ADN este se respondió en amortiguador de RNAsa A e incubó a 37°C durante una hora, al terminar la incubación se repitió todo el procedimiento, el botón de ADN resultante se resuspendió en 200 µl de agua inyectable, la disolución resultante se almacenó a -20°C hasta su uso (**Figura 5.1**) (López-Olmos *et al.*, 1998).

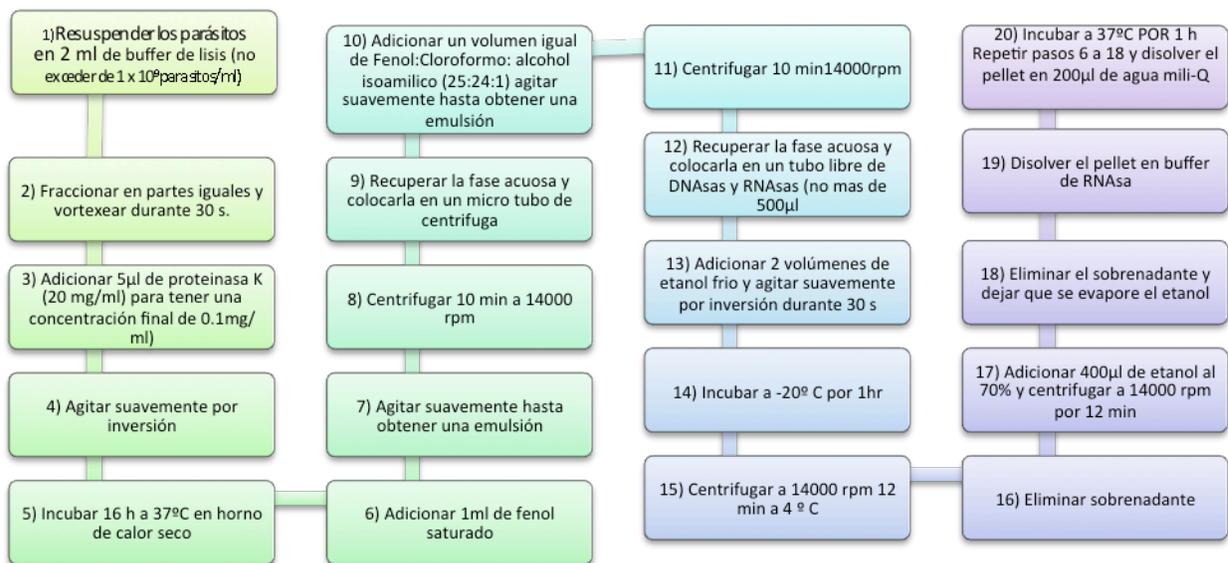


Figura 5.1 Diagrama de flujo de extracción de ADN por medio de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico. El ADN de las 47 cepas seleccionas se extrajo mediante esta técnica.

5.1.5 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 V 3.7. La cuantificación se realizó a 260 nm. Posteriormente se prepararon disoluciones de trabajo a 30 ng/μl. Para verificar la calidad y la cantidad de ADN extraído, se corrió un gel de agarosa al 1%, debido a que es indispensable que el ADN se encuentre en buenas condiciones para la realización del análisis por medio de microsatélites se volvió a extraer ADN de aquellas muestras en las que se observó degradación.

5.1.6 Amplificación y análisis de microsatélites

Se amplificaron seis microsatélites, los cuales fueron reportados en el 2001 por Macedo y colaboradores. Los primers que se utilizaron fueron: SCLE11-12, MCLG11-12, MCLF11-12, SCLE01-02, MCLE11-12 y MCL51-52 (*Macedo et al. 2001*) (**Tabla 5.2**). Las condiciones de la reacción de amplificación para todos los juegos de primers fueron: 0.4 μM de cada primer (Fw y Rvs), 0.2 mM dNTPs (c/u), 4 mM de MgCl₂ y 0.5 U Platinum *Taq* ADN polimerasa por reacción y 90 ng de ADN. Las mezclas de reacción que contenían los juegos de primers: SCLE 11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12, SCLE 1-2, MCLE 11-12; se sometieron a un ciclo de: 94°C 10 minutos, 95 °C 1 minuto, 59°C 2 minutos, y 72°C 2 minutos; y a 30 ciclos de: 95°C 1 minutos, 59°C 1 minuto y 72°C 1 minuto. Las mezclas de reacción que contenían el juego de primers MCL 51-52, se sometieron a un ciclo de: 94°C 10 minutos, 95°C 1 minuto, 59°C 2 minuto, y 72°C 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C 1 minuto, 57°C 1 minutos y 72°C 1 minuto.

Tabla 5.2 Secuencias de primers de microsatélites

Microsatélite	Primers 5"-3"
SCLE 11-12	Fw 5"-ACGACCA A AGCCATCAT T-3"
	Rvs 5"-GATGCTAACTGCTCAAGTGA-3"
MCLG 11-12	Fw 5"-AGGAGTCA A ATATA ATGAGGCA-3"
	Rvs 5"-ACGTGTGAAAGGCATCTATC-3"
MCLF 11-12	Fw 5"-GCGTAGCGAT TCAT T TCC-3"
	Rvs 5"-ATCCGCTACCACTATCCAC-3"
SCLE 1-2	Fw 5"-GATCCCGCA ATAGGA A AC-3"
	Rvs 5"-GTGCATGTTCCATGGCTT-3"
MCLE 11-12	Fw 5"-CTGCCATGT T TGATCCCT-3"
	Rvs 5"-CGTGACATATCGGCAGTG-3"
MCL 51-52	Fw 5"-T TA A ACGACCTCTATGTCTCTC-3"
	Rvs 5"-CCTGAGCAAGATACAAGGAC-3"

(Tomados de Oliveira et al., 1998)

Para resolver los productos de amplificación se sometieron 10 μl de productos de PCR a electroforesis durante aproximadamente dos horas a 100 Volts, en geles al 12% de acrilamida de 7.7 x 8.6 cm² (*Martínez, 2006*). Para observar los productos de amplificación los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio al 1% v/v durante 2 min. Para observar los amplificadores se

expuso a luz UV durante 0.1 s durante 29 exposiciones, los geles fueron documentados mediante un fotodocumentador Kodak Digital Science 1D.

5.1.7 Análisis Bayesiano de patrón de bandeo de los diferentes microsatélites

Con los diferentes fragmentos de amplificación obtenidos a partir de la amplificación de los 6 microsatélites se obtuvo una matriz binaria, en la cual si la cepa presentaba el fragmento de amplificación se colocaba 1 y si no se observaba se colocaba 0. Esta matriz fue analizada por medio del programa Mr. Bayes v 3.2.0. En el cual se generaron dendogramas por 1000000 de generaciones, se muestreó cada 100 generaciones y con los dendogramas muestreados se generó un dendograma el cual maximiza la probabilidad.

5.2.0 Segundo análisis de cepas representativas con microsatélites

Se seleccionaron de acuerdo al primer análisis 15 cepas mexicanas representativas, de las cuales 12 pertenecen al grupo genético TcI, tomando como criterio de selección la topología del dendograma obtenido al analizar las 47 cepas con microsatélites (ver resultados), el origen biológico y geográfico. En esta selección se incluyeron también las cepas mexicanas Querétaro, Ninoa, las cuales muestran diferente comportamiento en el proceso de invasión (*Espinoza et al., 2011*) y Ver 6 la cual es una cepa mexicana no TcI. En esta selección también se incluyó la clona Brasileña Cl Brener que pertenece al grupo genético TcVI (**Tabla 5.1**).

Se decidió reanalizar las cepas representativas, esta vez únicamente usando cinco microsatélites: SCLE 11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12, SCLE01-2, y MCL 51-52, en este caso no se analizó MCL 11-12 ya que en el análisis anterior se observó gran homogeneidad con él. Con esto se desea obtener mayor sensibilidad y definición de los fragmentos de amplificación, debido al uso de mayor muestra de amplificado y a la utilización de geles de mayor tamaño. Las condiciones de reacción fueron las mismas descritas en la sección 5.1.6, con la diferencia de que se sometieron a electroforesis 20 µl de productos de PCR en geles de poliacrilamida al 15% con una dimensión de 18 x 16 cm² durante aproximadamente ocho horas a 100 volts. Los resultados obtenidos se analizaron al igual que en la sección 5.1.7.

5.3.0 Amplificación y secuenciación de gen SL mini-exón y citocromo B mitocondrial

5.3.1 Amplificación gen SL mini-exón

Se realizó la reacción de PCR multiplex con los primers TC1 (5'GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC'3), TC2 (5'CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG'3) y TCC (5'CCCCCTCCCAGGCCACACTG'3) a las cepas representativas (**Tabla 5.1**). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 100 ng de ADN, cada primer a una concentración de 2 µM, 0.1 mM de dNTPs (c/u), 1 mM de MgCl₂ y 2.5U Taq

platinum por reacción. Dicha reacción de PCR se sometió a: 27 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y visualizaron con luz UV.

5.3.2 Amplificación del fragmento de 950 pb de citocromo B

Se realizó la reacción de PCR para la obtención del fragmento de 950 pb del gen de citocromo B mitocondrial de *T. cruzi*, usando los primers D (5'ATTATGTTACAGATAATATGTGGTGT'3) y R (5'GCTTATCCAATATGAATGGAATTACA'3) a las cepas 16 cepas representativas (**Tabla 5.1**), los cuales fueron diseñados por el Dr. Fernando Martínez (Hospital General Dr. Gea Gonzalez). Estos primers nos permiten obtener un amplificado de mayor longitud a comparación de los primers utilizados generalmente, los cuales tienen como producto un amplificado de 550 pb; la razón para usar los primers D y R, se debe a que mayor longitud del amplificado se espera obtener mayor información.

Las condiciones de la reacción fueron 200 ng de ADN (Se determinó esta cantidad de templado ya que es la cantidad a la cual se obtuvo mayor cantidad de producto de reacción), 5mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs(c/u), 1 mM de cada primer (D y R), 0.002 % de Tritón X100 y 2U de Taq Platinum. Dicha reacción de PCR se sometió a: 94°C por 1 minuto y 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 49° C por 50 segundos y 72°C por 1 minuto, al finalizar los 35 ciclos se somete a una extensión final de 72°C por 7 minutos. Estas condiciones de reacción fueron estandarizadas por el Dr. Fernando Martínez.

5.3.3 Extracción de productos de PCR

Se realizaron 10 reacciones de PCR, por cepa por cada uno de los genes analizados. El volumen total de las reacciones fue cargado en un gel preparativo de agarosa al 1.5% y corrido a 100 V. Al final de la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio, y se visualizaron con luz UV. Para purificar el amplificado de interés se cortó la banda correspondiente, y se purificó por medio del kit de QiAquick de la marca Qiagen (catalogo 28104). Los productos purificados fueron cuantificados por medio de Nanodrop y conservados a -20°C hasta su uso.

5.3.4 Secuenciación de productos de PCR

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el reactivo "BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit" de Applied Biosystems (*Foster City, CA*) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los primers que se utilizaron para la reacción de PCR para la obtención del amplificado de mini-exón fueron TC1 o TC2 (primer forward) y TCC (primer reverse). En el caso del amplificado de citocromo B se utilizaron los primers R (primer forward) y D (primer reverse).

Los productos de la reacción de secuenciación se precipitaron con etanol absoluto (2.5 volúmenes) y acetato de sodio 3 Mm (10%v/v), seguido de una centrifugación a 2000 x g por 30 min. El etanol remanente se eliminó volteando la placa y centrifugando de nueva cuenta a 150 x g por 1 minuto.

Posteriormente se realizó un lavado con etanol al 80% centrifugando por 5 minutos a 2000 x g. Al término de la centrifugación se decantó el etanol y centrifugó a 150 x g por 3 minutos para eliminar el etanol remanente. Se repitió este último paso para eliminar completamente el etanol. Ya purificados los productos de la reacción de secuenciación, éstos se disolvieron en 20 µl de formamida.

Las secuencias de los genes mini-exón y el fragmento del gen citocromo B de 950 pb se obtuvieron por electroforesis capilar en un secuenciador ABI-Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA*).

5.3.5 Edición y obtención de secuencia consenso de las secuencias Frw y Rvs

Con el programa Geneious Pro 5.5.5 (<http://www.geneious.com/web/geneious/download-geneious>) se eliminó parte de la secuencia donde no existía una señal clara, con este mismo programa se obtuvo la secuencia complementaria de la secuencia Reverse (Rvs), y esta a su vez se apareó con la secuencia Forward (Frw), con lo cual se obtuvo la secuencia consenso (**Figura 5.1**).



Figura 5.1 Proceso de edición y obtención de secuencia consenso de las secuencias Frw y Rvs. Con el programa Geneious Pro 5.5.5 se editaron las secuencias Frw y Rvs con las cuales se obtuvo la secuencia consenso.

5.4.0 Análisis filogenético

Para realizar el análisis de las secuencias del gen SL mini-exón y el fragmento de 950 pb de citocromo B, además de la secuencias obtenidas en este proyecto mitocondrial se utilizaron también secuencias de *T. cruzi* de estos genes extraídas del GenBank. En el caso de los análisis de redes y el análisis Bayesiano de las secuencias SL mini-exón y citocromo B mitocondrial de cepas Tc1 únicamente se incluyeron secuencias de clonas y cepas que anteriormente se habían reportado

como TcI. Para el análisis de redes y análisis Bayesiano que se realizó a las secuencias de citocromo B mitocondrial y SL mini-exón de las cepas no TcI, se bajaron del Genbank únicamente secuencias de cepas y clonas representativas de cada DTU (Zingales *et al.*, 2009).

Tanto para el análisis Bayesiano y de redes de los genes: SL mini-exón y citocromo B fue necesario realizar un alineamiento que incluyera las secuencias de las cepas mexicanas y las obtenidas del GenBank. Para ello se utilizó el programa Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) el cual contiene Clustal X, la cual es una herramienta que nos permite realizar un primer alineamiento. Posteriormente se refinó el alineamiento de forma manual.

5.4.1 Análisis Bayesiano

Se eligió el modelo de sustitución de ADN que mejor se ajustara a las secuencias por medio del criterio de Akaike implementado en el programa Model Test 3.7 (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>). El análisis Bayesiano de cada gen se realizó usando el programa Mr. Bayes 3.1.2. (<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>). Se corrieron dos análisis independientes de inicio aleatorio, usando como método de muestreo las cadenas de Monte Carlo Markov, las cuales muestrean la distribución de la probabilidad posterior (Ronquist y Huelsenbeck; 2003), por medio de tres cadenas calientes y una fría durante 1000000 de generaciones muestreando cada 100 generaciones. Los árboles consensos fueron visualizados y editados por medio del programa Figtree v 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (**Anexo 1**).

5.4.2 Análisis de redes Median Joining (MJ)

Para obtener los diferentes genotipos se realizaron redes MJ (median joining). Para construir las redes filogenéticas fue necesario pasar de formato “meg.” a formato “rdf”, usando el programa DNA Aligment 1.3.0.1. (Fluxus Technology Ltd.) Ya con el alineamiento pasado a formato rdf., las redes fueron construidas por medio del programa Network 4.6.1.0. (Fluxus Technology Ltd.), para construir las redes se utilizó el método Median Joining (MJ) y posteriormente fueron posprocesadas por máxima parsimonia (MP), el cual elimina los sitios no parsimoniosos, para darnos la red filogenética más corta (**Anexo 2**).

6.0 Resultados

6.1.0 Análisis de microsátélites

6.1.1 Descripción del grupo de estudio

De las 47 cepas analizadas con los microsátélites: SCLE 11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12, SCLE 1-2, MCLE 11-12 y MCL 51-52, el 24% de las cepas provenían de Nayarit, 17% de Zacatecas, 11% de Yucatán, 9% de Jalisco, 9% de Morelos, 9% de Veracruz, 6 % de Guerrero, 7% Oaxaca, 4% de Guanajuato, 2% San Luis Potosí y 2% de Colima. En cuanto al origen biológico de las cepas, el 27% de las cepas provienen de humano. El 59% eran cepas de origen vectorial; de las cuales: el 22% pertenecen al *Complejo Phillosoma*, el 20% a *T. longipennis*, el 7% a *T. manzontii*, el a 4% *T. barberi*, el a 4% *T. picturata* y el 2% a *T. pallidipennis*. Mientras que el 9% eran cepas aisladas a partir de reservorios, de estas: el 5% de *D. virginiana* el 2% de *D. marsupialis* y el 2% de *D. oposum*; finalmente el origen biológico del restante 5%, se desconoce su origen. (Figura 6.1).

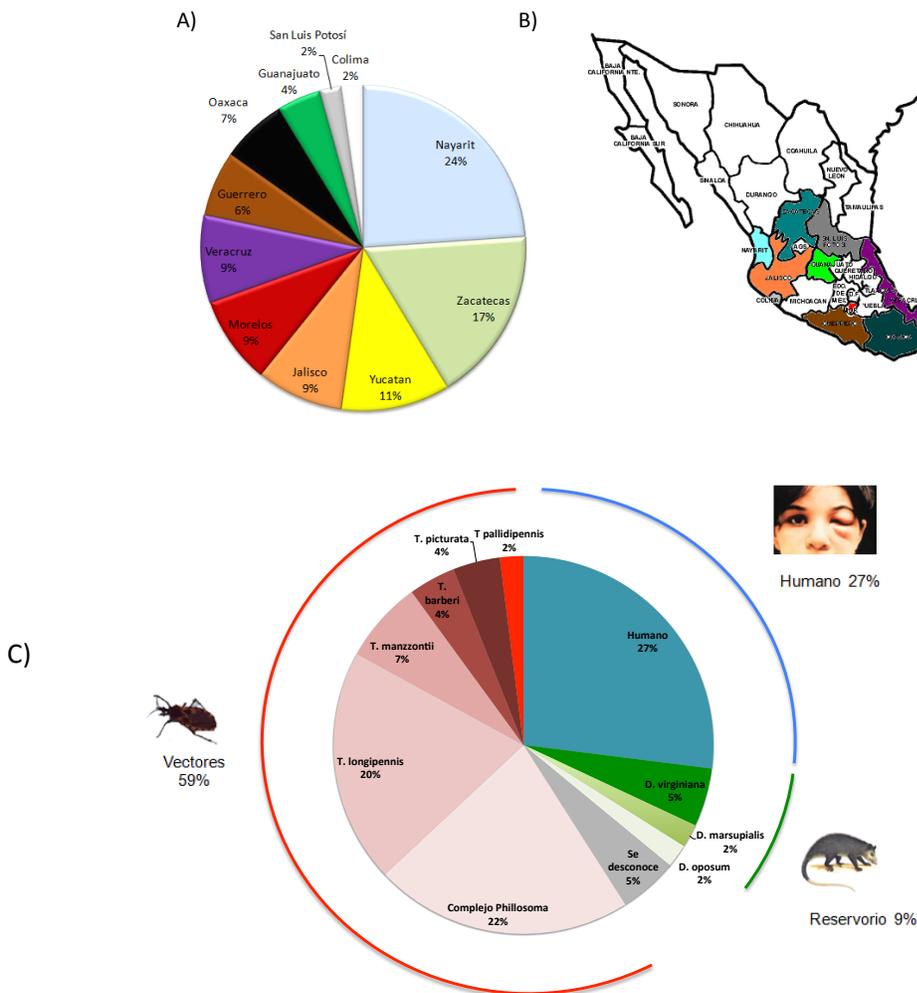


Figura 6.1 Origen Geográfico y Biológico de cepas de *Trypanosoma cruzi* mexicanas analizadas por medio de microsátélites. Los aislados son en su mayoría de las regiones que se encuentran mayormente afectadas por la enfermedad de Chagas. A) Porcentaje de cepas pertenecientes a las diferentes estados de la República Mexicana, B) Localización de los estados de donde provienen las cepas C) Origen biológico de los aislados.

6.1.2 Análisis de geles de acrilamida al 12% de productos de PCR de micro satélites

Al realizar el análisis de todos los fragmentos de amplificación obtenidos con los diferentes microsátélites, fue posible encontrar que las cepas en general presentaban gran homogeneidad, a pesar de ello en algunos casos era posible observar algunas diferencias. Por ejemplo: El gel mostrado en la **Figura 6.2**, es un gel representativo del PCR del microsátélite MCLG 11-12, en este gel es posible observar que la mayor parte de las cepas son homogéneas, a pesar de ello la cepa Cari 43 presenta un patrón de bandeo diferente a todas las demás cepas.

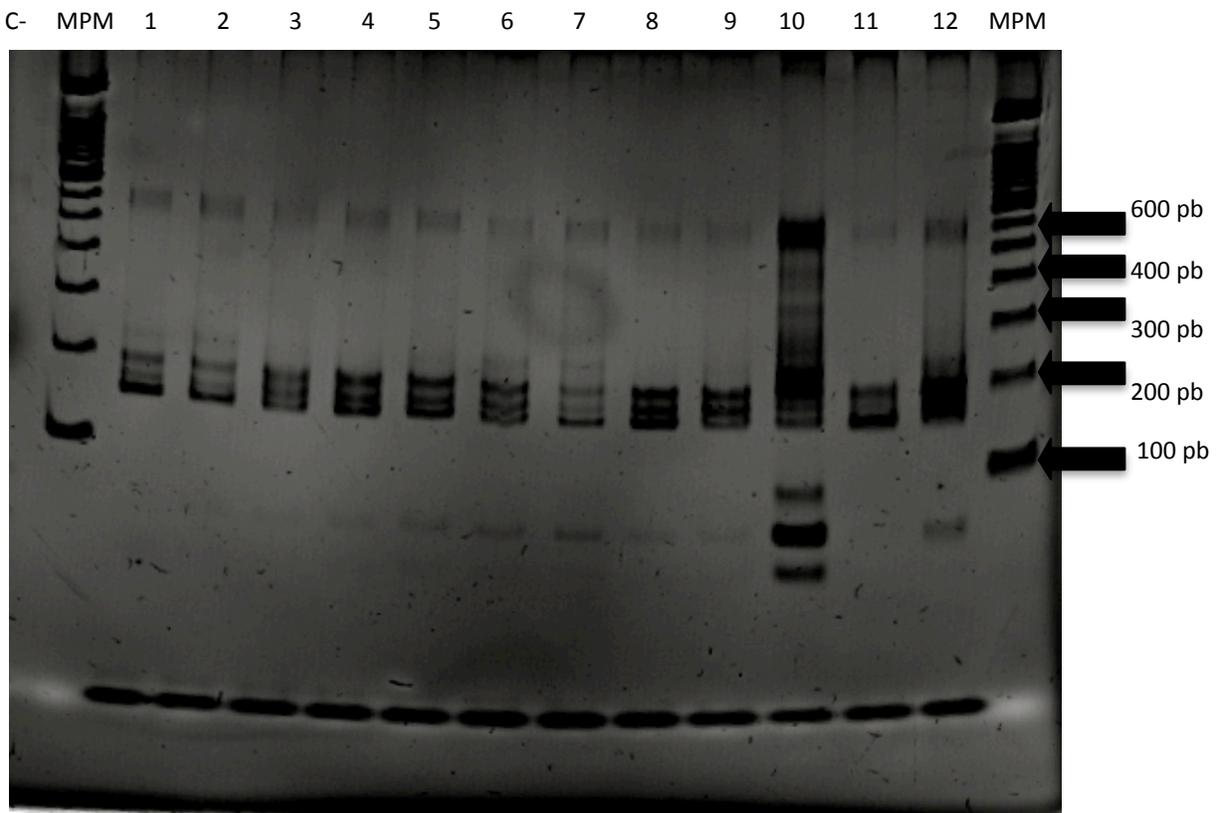


Figura 6.2 Gel de acrilamida al 12% con productos de reacción de MCLG 11-12. Es posible observar que la mayor parte de las cepas muestran un patrón de bandeo similar (carril 1-9 y 11-12). Carril: Control -, 1) INC 6 (Control +), 2) CRISTI, 3) Cari 111, 4) Cari 44, 5) CopGro, 6) Ver 5, 7) Col 1, 8) Ver 4, 9) Nay 1, 10) Cari 43, 11) Mor 11 12) Nay 16.

Para determinar el peso molecular de cada fragmento de amplificación se realizó una regresión lineal entre logaritmo natural del corrimiento de cada marcador de peso molecular (eje de las X) y peso molecular de este (eje de las Y). Con la ecuación resultante se puede saber el peso molecular de cada banda, al sustituir X por el logaritmo natural del corrimiento de la banda analizada en la ecuación obtenida en la regresión lineal, es importante aclarar que por cada gel se realizó una curva de calibración (**Figura 6.3**).

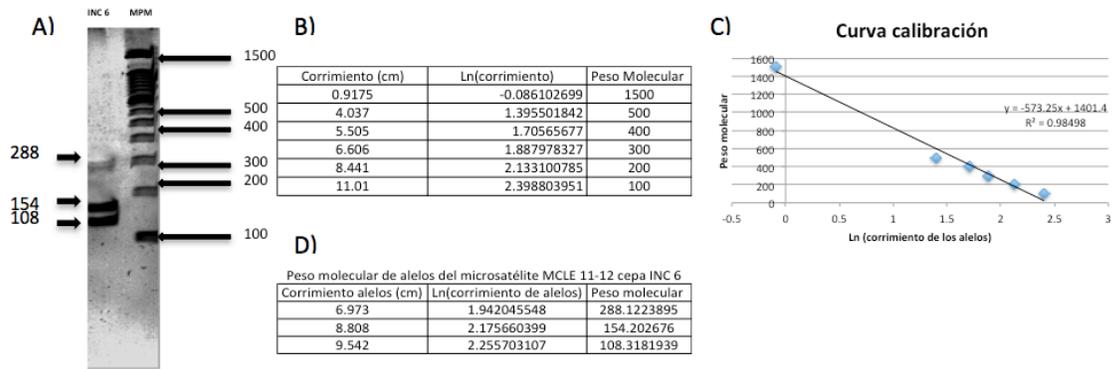


Figura 6.3 Ejemplo de determinación de peso molecular de las bandas obtenidas con los primers MCLE 11 y 12 de la cepa INC 6. A) Gel de acrilamida al 12% donde se analizó la cepa INC 6 con el microsatélite MCLE 11-12 B) Tabla donde se muestra la distancia de corrimiento de los marcadores moleculares. C) Curva de calibración del gel. D) Pesos moleculares de cada banda obtenidas con los primers MCLE 11-12.

De este modo se obtuvieron los pesos moleculares de todos los fragmentos de amplificación obtenidos, considerándose que cada uno de estos fragmentos son un alelo, utilizando los 6 diferentes microsatélites para cada cepa. Al analizar todas las cepas se determinó el número de fragmentos de amplificación resultantes por cada marcador molecular (**Tabla 6.1**), los pesos moleculares de cada fragmento de amplificación se encuentran en el **Anexo 3**. Encontrándose que los fragmentos de amplificación de MCLE 11-12 son altamente homogéneos, por lo tanto son poco informativos.

Tabla 6.1 Fragmento de amplificación encontrados por cada microsatélite

Microsatélite	Numero de fragmentos de amplificación
MCLE 11-12	10
SCLE 11-12	11
MCLF 11-12	14
SCLE 01-02	15
MCLG 11-12	16
MCL 51-52	16
Total de los fragmentos de amplificación	82

Contando con el número de fragmentos de amplificación obtenidos con los 6 microsatélites, se contó con 82 fragmentos de amplificación totales. Con los cuales se construyó una matriz binaria, en la cual se representó la presencia del fragmento de amplificación con el número 1 y la ausencia con el número 0 (**Figura 6.4**).

6.1.3 Análisis Bayesiano de matriz binaria

A partir de la matriz binaria construidas con los diferentes fragmentos de amplificación de los microsátélites: *SCLE 11-12*, *MCLE 11-12*, *MCLG 11-12*, *MCLF 1-12*, *SCLE 01-02* y *MCL 51-52*, se realizó un análisis Bayesiano por medio del programa Mr. Bayes v 3.2.0. En este análisis se incluyeron dos cepas referencia; la cepa CI Brener la cual pertenece a TcVI y la cepa mexicana TcI Inc 6, la cual fue caracterizada por este método anteriormente en el laboratorio.

En el dendograma obtenido es posible observar que la mayor parte de las cepas se agrupan en la misma rama en la cual se encuentra la cepa INC 6, la cual a sido anteriormente caracterizada y pertenece al DTU Tc I, también es posible observar que la cepa mexicana Ver I forma al igual que CI Brener una rama independiente. En el agrupamiento principal, es decir la rama que contiene INC6, Se logra observar que las cepas de origen humano se agruparon, mientras existe una rama en la cual se encuentran agrupadas las cepas Cux, las cuales provienen de Cuxpala, Zacatecas; otro agrupamiento que fue posible identificar fue el de las cepas Cari, las cuales provienen de Nayarit forman otra rama independiente la cual también contiene cepas de Guerrero y Jalisco. A pesar de que encontramos esta tendencia de agrupamiento entre algunas cepas, el árbol no tienen un buen soporte estadístico, puesto que la mayoría de los valores de probabilidad posterior son menores a 0.75 (**Figura 6.5**).

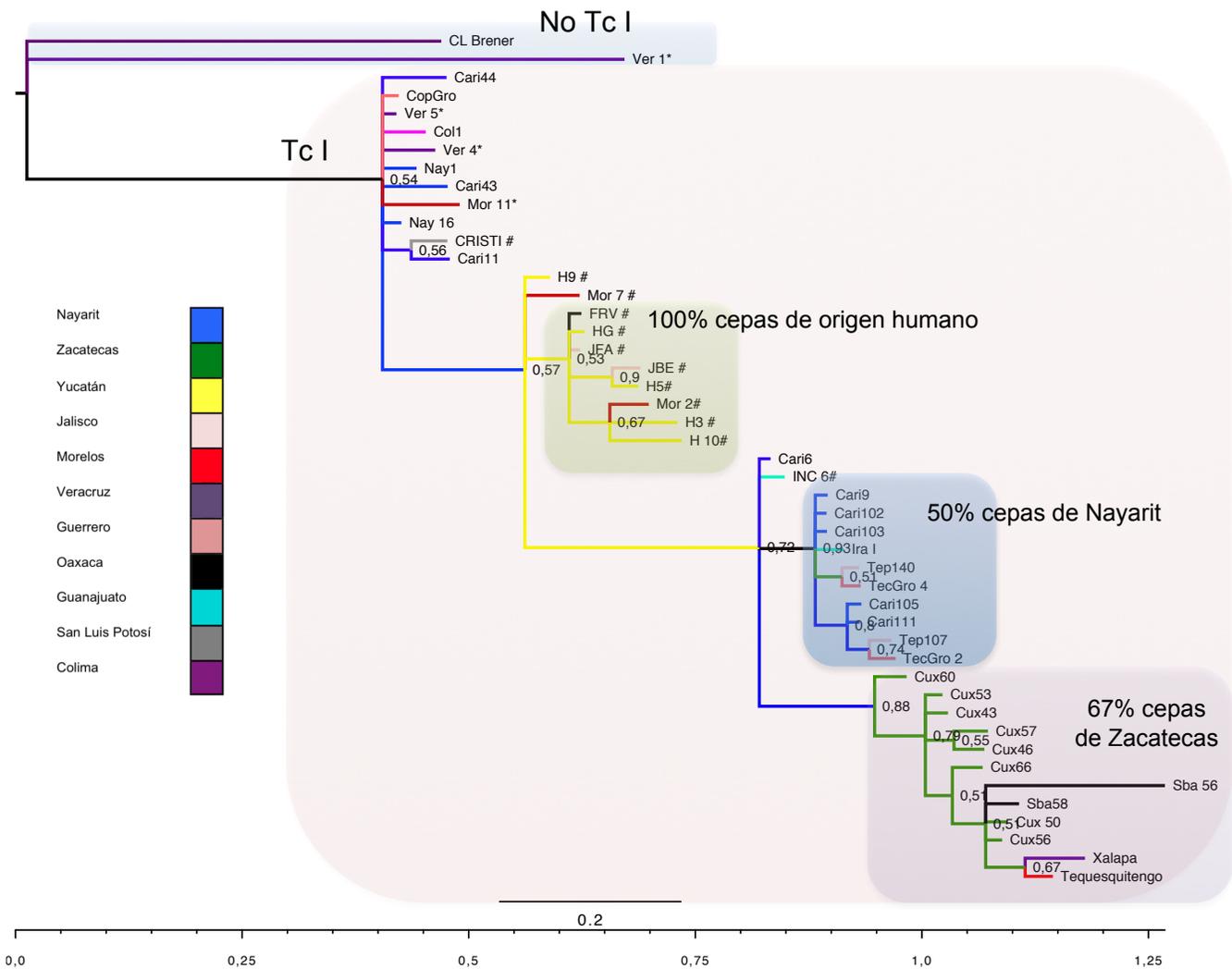


Figura 6.5 Dendrograma de microsatelites SCLE 11-12, MCLE 11-12, MCLG 11-12, MCLF 1-12, SCLE 01-02 y MCL 51-52. Cada rama se coloreo de acuerdo a su origen geografico (ver codigo de colores), las cepas aisladas de reservorio se identifican con(*), las de origen humano con (#). Es posible observar que la mayoría de las cepas se agrupan en una gran rama en la cual se encuentra incluida la cepa Inc 6, que fue caracterizada con mini exón y pertenece a Tc I, la cepa Ver I, forma una rama a parte al igual que la cepa Cl Brener. Dentro de la rama es posible observar un agrupamiento entre las cepas de origen humano, las cuales se marcaron en un cuadrado verde, al igual que el agrupamiento entre las cepas Cux (cuadrado azul) y el agrupamiento de las cepas Cari (cuadrado purpura). Abajo del dendrograma se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.2.0 Segundo análisis con microsatélites mejorando condiciones

A partir del dendrograma obtenido en el análisis Bayesiano de los microsatélites, se decidió seleccionar 12 cepas, las cuales se consideraron representativas del grupo de estudio, el criterio de selección se basó en la topología del dendrograma obtenido anteriormente (**Figura 6.5**) y el origen biológico y geográfico, En esta selección también se incluyeron las cepas mexicanas Querétaro, Ninoa (anteriormente caracterizadas biológicamente) y Ver 6 (cepa no TcI), al igual que la clona Brasileña Cl Brener como referencia (clona TcVI).

Al volver a analizar las 16 cepas seleccionadas sólo con los microsatélites: SCLE11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12, MCL51-52 y SCLE 1-2, los cuales demostraron mayor variabilidad; y analizar los productos de la reacción en geles de mayor tamaño de acrilamida al 15%, encontramos que se pierde la sensibilidad con la mayoría de los microsatélites, ya que se observó en casi todos los casos gran homogeneidad en el patrón de bandeo. Este fenómeno se lo podemos atribuir a que al ser más grandes los geles no se pudo realizar un acercamiento al fotodocumentar tal que permitiera observar las bandas menos intensas y al mismo tiempo obtener una imagen del gel completo. A pesar de ello, se observó que al analizar los productos de PCR de los primers SCLE1-2, aumento la resolución de las bandas, ya que fue posible observar 3 diferentes patrones de bandeos; uno correspondiente a las cepas No TcI y dos pertenecientes a cepas TcI (**Figura 6.6**).

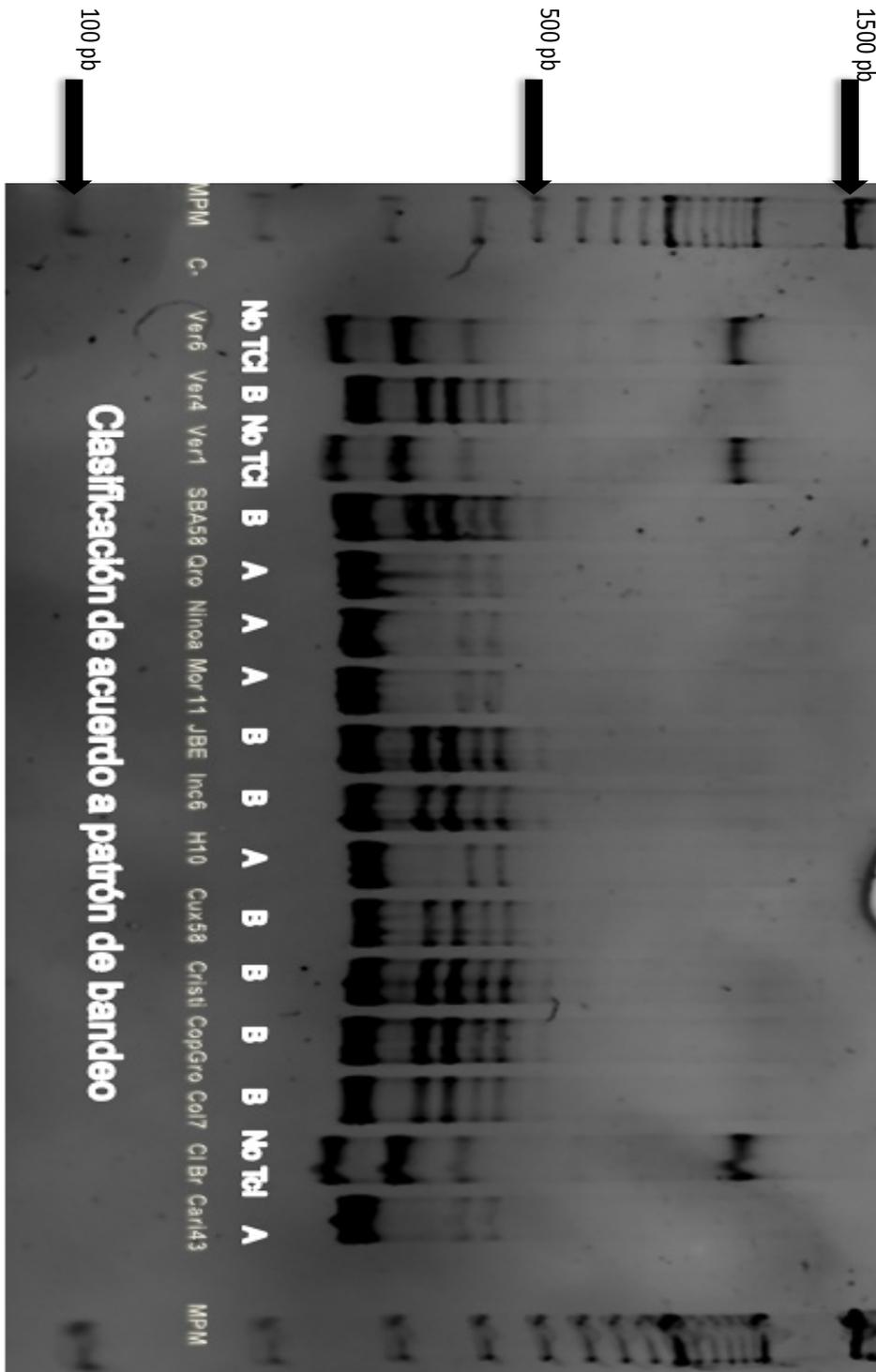


Figura 6.6 *Diferentes patrones del microsatélite SCLE 1-2 de las cepas representativas.* A continuación se muestra un gel de acrilamida al 15% de 17x18 cm, en el cual posible distinguir tres diferentes patrones de bandeo, uno correspondiente a las cepas no Tci, y dos correspondientes a cepas Tci, los cuales se denominaron grupo genético A y B del microsatélite SCLE 1-2.

6.2.1 Análisis Bayesiano de microsatélites SCLE 1-2

Debido a la alta homogeneidad observada, con los microsatélites: SCLE11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12 y MCL51-52, se decidió analizar únicamente el patrón de bandeo obtenido con el microsatélite

SCLE 1-2, que dio resultados más variados. Para ello se realizó una matriz binaria y esta se analizó en el programa Mr. Bayes v 3.2.0.

El resultado del análisis Bayesiano nos arrojó un dendograma que todas las cepas Tc I se agrupan en una sola rama. En la rama de las cepas TcI es posible distinguir, el subgrupo de los no agrupados, el cual tiene un patrón de bandeo tipo A y el subgrupo que tiene un patrón de bandeo tipo B. Es importante resaltar que el subgrupo conformado por Cari 43 y H10 no se tomó en cuenta, ya que los valores de probabilidad posterior son menores a 0.75, mientras que el subgrupo con patrón de bandeo tipo B si se tomo en cuenta ya que tiene una probabilidad posterior de 0.95 (Figura 6.7).

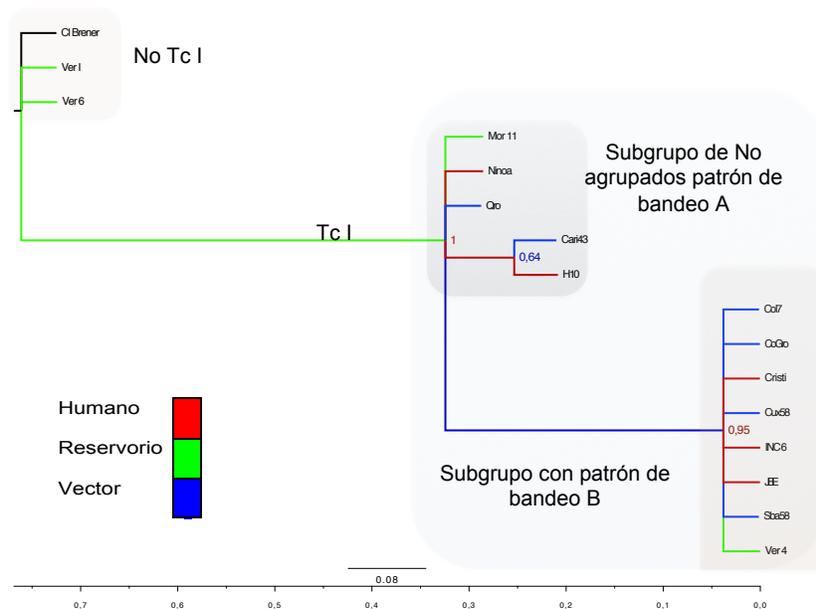


Figura 6.7 dendograma de patrón de bandeo obtenido a partir del microsatélite SCLE 1-2. Es posible distinguir dos grupos genéticos principales, la rama donde se encuentran las cepas no TcI y la rama donde se encuentran las cepas TcI. En esta rama es posible distinguir dos grupos genéticos, el grupo A y B. Las ramas presentan diferente color, de acuerdo a su origen biológico. Abajo del dendograma se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

Al analizar la relación entre origen biológico y geográfico con el grupo genético del microsatélite SCLE 1-2, no se encontró una clara relación, lo cual se pudo deber a que el grupo de estudio era pequeño, por tanto se decidió analizar los productos de SCLE 1-2 en geles de 18x 17 cm² de 55 cepas mexicanas, en las cuales se incluyeron las 47 cepas analizadas anteriormente (Tabla 6.3).

El resultado del análisis de las 55 cepas mexicanas con el microsatélite SCLE 1-2, fue que el 27% pertenecen al subgrupo con patrón de bandeo tipo A, mientras que el 73% pertenecen al subgrupo con patrón de bandeo tipo B. Al buscar una relación entre origen geográfico y subgrupo, no se

encontró ninguna relación. A pesar de ello, al analizar la relación entre origen biológico y subgrupo se encontró que el 80% de las cepas pertenecientes al subgrupo con patrón de bandeado tipo A habían sido aisladas de humanos, mientras que el 85% de las cepas pertenecientes al subgrupo con patrón de bandeado tipo B habían sido aisladas de vector (**Figura 6.8**).



Figura 6.8 Cepas analizadas con SCLE 1-2. En el gel de acrilamida al 15% de 17x18 cm fue posible observar las relaciones entre genotipo y origen geográfico, en este gel se analizan 12 cepas mexicanas diferentes. Como se puede observar en el gel, la mayor parte de las cepas analizadas pertenecen al genotipo B.

Tabla 6.3 Cepas Tc I analizadas con microsatélites SCLE 1-2

Clave	Cepa	Estado	Localidad	Origen biológico	Genotipo SCLE 1-2
TPIR/MX/1999/Cari 006	Cari 6	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>T. picturata</i>	B
T000/MX/1999/Cari 009	Cari 9	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/1999/Cari 011	Cari 11	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/1999/Cari 043	Cari 43	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	A
T000/MX/1999/Cari 044	Cari 44	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>T. picturata</i>	B
T000/MX/0000/Cari 102	Cari 102	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/0000/Cari 103	Cari 103	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/0000/Cari 105	Cari 105	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/0000/Cari 111	Cari 111	Nayarit	Carrillo Puerto	<i>C. Phyllosoma</i>	B
TLON/MX/1998/Col 18	Col I	Colima	-----	<i>T. longipennis</i>	B
TPAP/MX/1998/Col 07	Col 7	Colima	Nogueras	<i>T. pallidipennis</i>	B
TMAZ/MX/2008/Copgro	CopGro	Guerrero	San Francisco	<i>T. mazzotti</i>	B
MHOM/MX/2007/Cristi	CRISTI	San Luis Potosí	Tamazunchale	<i>Humano</i>	B
TPHY/MX/1999/Cux 43	Cux 43	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>	B
TLON/MX/1999/Cux 46	Cux 46	Zacatecas	Cuxpala	<i>T. longipennis</i>	B

TLON/MX/1999/Cux 50	Cux 50	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
TLON/MX/1999/Cux 53	Cux 53	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
TLON/MX/1999/Cux 56	Cux 56	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
TLON/MX/1999/Cux 58	Cux 58	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
TLON/MX/1999/Cux 60	Cux 60	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
TLON/MX/1999/Cux 66	Cux 66	Zacatecas	Cuxpala	T. longipennis	B
MHOM/MX/0000/FRV	FRV	Oaxaca	-----	Humano	A
TPIR/MX/0000/Guaymas	Guaymas	Sinaloa	Guaymas	-----	B
MHOM/MX/0000/H002	H 3	Yucatán	-----	Humano	A
MHOM/MX/0000/H005	H 5	Yucatán	-----	Humano	A
MHOM/MX/0000/H009	H 9	Yucatán	-----	Humano	A
MHOM/MX/0000/H010	H 10	Yucatán	-----	Humano	A
MHOM/MX/0000/HG	HG	Yucatán	-----	Humano	A
MHOM/MX/2000/INC-6	Inc 6	Guanajuato	San Pedro Tututepec	Humano	B
TPAP/MX/2010/IRA-1	Ira 1	Guanajuato	Irapuato	Vector	B
MHOM/MX/0000/JBE	JBE	Jalisco	-----	Humano	B
MHOM/MX/0000/JFA	JFA	Jalisco	-----	Humano	A
MHOM/MX/0000/JJO	JJO	Jalisco	-----	Humano	A
MHOM/MX/1995/MOR002	Mor 2	Morelos	Temixco	Humano	A
MHOM/MX/1995/MOR003	Mor 3	Morelos	Temixco	Humano	B
MHOM/MX/1995/MOR007	Mor 7	Morelos	Xochitepec	Humano	A
MDID/MX/1997MOR011	Mor 11	Morelos	Temixco	<i>D. virginiana</i>	A
T000/MX/0000/Nay 01	Nay 1	Nayarit	Puga	<i>C. Phyllosoma</i>	B
TLON/MX/0000/Nay 16	Nay16	Nayarit	Puga	<i>T. longipennis</i>	B
MHOM/MX/1994/Ninoa	Ninoa	Oaxaca	-----	Humano	A
TBAR/MX/0000/Queretaro	Qro	Queretaro	-----	T. s.p.	A
TBAR/MX/1998/Sba 56	Sba 56	Oaxaca	San Bartolo de Coyotepec	T. barberi	B
TBAR/MX/1998/Sba 58	Sba 58	Oaxaca	San Bartolo de Coyotepec	T. barberi	B
TMAZ/MX/2006/Tecgro 002	TecGro 2	Guerrero	-----	T. mazzotti	B
TMAZ/MX/2006/Tecgro 004	TecGro 4	Guerrero	-----	T. mazzotti	B
T000/MX/1998/Tep107	Tep 107	Jalisco	Cruzero de San Martin	<i>C. Phyllosoma</i>	B
T000/MX/1998/Tep 140	Tep140	Jalisco	Tepehuaje	<i>C. Phyllosoma</i>	B
Tpap/mx/1991/Tequesquitengo	Tequesquitengo	Morelos	Tequesquitengo	T. pallidipennis	B
MDID/MX/1991/VER004	Ver 4	Veracruz	-----	<i>D. marsupialis</i>	B
MDID/MX/1989/VER 005	Ver 5	Veracruz	-----	<i>D. oposum</i>	B
TDIM/mx/2003/Xalapa	Xalapa	Veracruz	Xalapa	-----	B

6.3.0 Análisis Filogenético SL mini-exón

Las trece secuencias de mini-exón pertenecientes a las cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* TcI, fueron analizadas por medio del programa Mega 5. En dicho análisis se encontró que 238 sitios de 267 sitios eran conservados, mientras que 22 eran variables, de los cuales 4 únicamente son informativos (**Figura 6.9**).

1----- 100

Cari43 CCTGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGTCTGCGTGT-CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Col7 -----GTGTGTG-----CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

CopGro CCTGCAGGCAACACGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTG-CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

CRISTI -----TGCTTGTGTGTGTG-----CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

CUX58 --TGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGCATGTGTGCTG-CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

INC6 -----ACGT----GTGTGTGTGT--ATGTATGTGTGTGCCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

JBE ---CAGG-CACACGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTAA-----CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Mor11 -----GTGTGTG-----CCCC--CCC-CCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Ninoa CCTGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGTACGTGTGTGTC-CC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Qro --TGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGTA--CGTGTGTGCCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Sba56 CCTGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGTATGTGTGTG-CCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

Ver4 CCTGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGCCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

H10 --TGCAGG-CACAC----GTGTGTGTGTATGCATGTGTGC-TGCCCC-ACCCACCTCCGGCTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCG

101----- 200

Cari43 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Col7 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

CopGro CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

CRISTI CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

CUX58 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

INC6 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

JBE CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Mor11 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Ninoa CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Qro CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Sba56 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

Ver4 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

H10 CAAGCACGGTGCCTGTCGTGT-CCGTCTCGTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTACGGTGTTCGCTGCGTTTTTGGTGTCTTCTGC

201-----270

Cari43 TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Col7 TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

CopGro TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

CRISTI TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

CUX58 TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

INC6 TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

JBE TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Mor11 TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Ninoa TTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Qro TTTTTCCTCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Sba56 TTTTTCCTCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Ver4 TTTTTCCTCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAT--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

H10 TTTTTCCTCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCGCCTGCAC--ACACCGCTCC-GCA-CGCATT-AGTC

Figura 6.9 Alineamiento de gen de mini-exón de cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* pertenecientes al DTU Tc I. El alineamiento se encuentra en formato Nexus, es posible observar una gran homogeneidad.

Las 13 secuencias mexicanas de SL mini-exón de cepas TcI se integraron a un alineamiento en el cual se contaban con 163 secuencias de diferentes países de Latinoamérica obtenidas de la base de datos del Genbank, muchas de ellas anteriormente descritas (**Tabla 6.4**).

Tabla 6.4 Secuencias obtenidas del Genbank de SL mini-exón de aislados Tc I

Clave	Nombre	País de origen	Origen Biológico	Subgrupo genético de TcI anteriormente reportado	Referencia
GU936800	798R1	Argentina	T. Infestans	A	(Cura et al., 2010)
GU936819	802-R1	Argentina	T. Infestans	chaco3	(Tomasini et al 2011)
FJ713358	AY	Argentina	Humano	D	(Cura et al., 2010)
GU179066	CA-I CL72	Argentina	-----	A	(Cura et al., 2010)
GU936808	Da28-963A	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
FJ713371	FRA	Argentina	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU179065	K98	Argentina	-----	A	(Cura et al., 2010)
GU936820	LL017-Po0-RO	Argentina	T. Infestans	E	(Tomasini et al., 2011)
GU936818	LL022-1R2	Argentina	T. Infestans	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936821	LL027-21R1	Argentina	T. Infestans	E	(Tomasini et al., 2011)
GU936822	LL027-21R2	Argentina	T. Infestans	E	(Tomasini et al., 2011)
GU936817	LL040-p33R1	Argentina	Canis familiaris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936814	LL051-P23R0	Argentina	C. familiaris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU179067	MIRANDA CL78	Argentina	-----	A	(Herrera et al., 2007)
FJ713382	Pa	Argentina	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU936807	PalDa1cl9	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936811	PalDa20Cl3	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936810	PalDa22cl7	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936805	PalDa24	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco2	(Tomasini et al., 2011)
GU936813	PalDa25	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936816	PalDa31-Pol-R1	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936806	PalDa3cl4	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco2	(Tomasini et al., 2011)
GU936812	Palda4cl8	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
FJ713383	PALV1C11	Argentina	Triatoma infestans	E	(Cura et al., 2010)
GU936823	PALV1cl1	Argentina	Triatoma infestans	E	(Cura et al., 2010)
FJ713384	PALV2-1C14	Argentina	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU936824	PALV2-2cl5	Argentina	Triatoma infestans	E	(Tomasini et al., 2011)
GU179064	PASch	Argentina	Humano	A	(Cura et al., 2010)

FJ713385	PAVOOC17	Argentina	Triatoma infestans	-----	(Cura et al., 2010)
GU936802	RATA3 938A	Argentina	R. rattus	A	(Cura et al., 2010)
GU903135	SE 9V	Argentina	Humano	E	(Cura et al., 2010)
FJ713400	TA	Argentina	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU936809	TEDa2cl4	Argentina	Didhelfis albiventris	chaco3	(Tomasini et al., 2011)
GU936803	TEV55cl1	Argentina	T. Infestans	chaco2	(Tomassini et al 2011)
EF576832	Tev91 cl1/(a)	Argentina	Triatoma infestans	A	(Cura et al., 2010)
EF576831	Tev91 cl3/(c)	Argentina	Triatoma infestans	A	(Cura et al., 2010)
GU936801	TEV91cl5	Argentina	T. Infestans	A	(Cura et al., 2010)
GU179069	V75 C17	Argentina	Triatoma infestans	-----	(Cura et al., 2010)
FJ713404	VA	Argentina	Humano	D	(Cura et al., 2010)
GU903124	13379 CL7	Bolivia	Humano	E	(Cura et al., 2010)
FJ713356	As	Bolivia	Humano	E	(Cura et al., 2010)
AY367129	Cutia	Brasil	-----	-----	(Cura et al., 2010)
GU179068	D11	Brasil	-----	D	(Cura et al. 2010)
FJ713372	G	Brasil	Didhelfis marsupialis	D	(Cura et al., 2010)
FJ713407	Silvio X10	Brasil	-----	D	(Cura et al., 2010)
GU903125	Col 108	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903129	Gaj29 cl6	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903127	Gaj29 cl7	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903128	Gaj29 cl8	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903130	LGN cl7	Chile	Humano	E	(Cura et al., 2010)
GU903131	LGN cl8	Chile	Humano	E	(Cura et al., 2010)
GU903141	Sp Guayan	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903138	Sp104	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903139	Sp130 cl16	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903140	Sp130 cl18	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903136	Sp31	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903137	Sp54	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903142	STPil cl6	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903143	STPil cl7	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903144	STPil cl8	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
FJ713401	TCC	Chile	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU903145	Ti170 cl6	Chile	Mepraia spinolai	D	(Cura et al., 2010)
GU903146	Ti170 cl7	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903147	Ti170 cl8	Chile	Mepraia spinolai	E	(Cura et al., 2010)
GU903155	WT Cl6	Chile	Humano	E	(Cura et al., 2010)
GU903156	WT Cl7	Chile	Humano	A	(Cura et al., 2010)
AM259469	FCH	Colombia	-----	B	(Herrera et al., 2007)
FJ713357	Amp7	Colombia	Pastrongylus geniculatus	-----	(Cura et al., 2010)
FJ713359	Cas1	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Cura et al., 2010)
FJ713360	Cas10	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Cura et al., 2010)
FJ713361	Cas15	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Cura et al., 2010)
FJ713362	Cas16	Colombia	Rhodnius prolixus	B	(Cura et al., 2010)
FJ713363	Cas18	Colombia	Dhidelphis marsupialis	D	(Cura et al., 2010)

FJ713364	Cas19	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Cura et al., 2010)
FJ463160	Cepa2	Colombia	-----	B	(Cura et al., 2010)
FJ713366	CHA	Colombia	Humano	D	(Cura et al., 2010)
EU626736	Coy11 C	Colombia	Rhodnius colombinus	D	(Cura et al., 2010)
FJ713367	Coy8	Colombia	Didelfis marsupialis	D	(Cura et al., 2010)
FJ713368	Coy9	Colombia	Rhodnius colombinus	D	(Cura et al., 2010)
EU626729	D12 C	Colombia	D marsupialis	D	(Falla et al., 2009)
EU626723	DA C	Colombia	Humano	A	(Falla et al., 2009)
EU626728	DYR C	Colombia	Humano	A	(Falla et al., 2009)
EU626726	EB2d C	Colombia	Humano	A	(Falla et al., 2009)
FJ713370	Fer1	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al., 2010)
EU626731	Gal61 C	Colombia	-----	D	(Cura et al., 2010)
EU626730	H10 C	Colombia	Canis familiaris	B	(Falla et al., 2009)
FJ713373	HA	Colombia	Humano	A	(Cura et al., 2010)
EU626725	JV C	Colombia	Humano	B	(Falla et al., 2009)
FJ713375	LB53	Colombia	Triatoma dimidiata	D	(Cura et al., 2010)
FJ713376	Medellin	Colombia	-----	D	(Cura et al. 2010)
FJ713380	MG	Colombia	Humano	-----	(Cura et al. 2010)
FJ713377	Mg1	Colombia	R. pallescens	D	(Cura et al. 2010)
FJ713379	Mg11	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al. 2010)
FJ713378	Mg6	Colombia	Pastrongylus geniculatus	B	(Cura et al. 2010)
EU626738	Mg9 C	Colombia	T. dimidiata	B	(Falla et al., 2009)
EU626733	N5P14 C	Colombia	rhodnius prolixus	D	(Falla et al., 2009)
GU179078	Necoclic2	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al. 2010)
GU179079	Necoclic3	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al. 2010)
GU179080	Necoclic4	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al. 2010)
GU179081	Necoclic5	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al. 2010)
EU626735	Necoli C	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Falla et al., 2009)
EU626724	NV C	Colombia	Humano	A	(Falla et al., 2009)
FJ713381	Ov17	Colombia	Pastrongylus geniculatus	D	(Falla et al., 2009)
FJ713387	Put4	Colombia	Rhodnius robustus	D	(Cura et al., 2010)
EU626734	Rp513 C	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Falla et al., 2009)
EU626732	Rp523 C	Colombia	rhodnius prolixus	D	(Falla et al., 2009)
FJ713388	Sebas1	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al., 2010)
FJ713389	Sebas16	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al., 2010)
EU626727	SEV C	Colombia	Humano	A	(Falla et al., 2009)
FJ713393	SN11	Colombia	Rhodnius prolixus	-----	(Falla et al., 2009)
FJ713394	SN12	Colombia	Rhodnius prolixus	A	(Falla et al., 2009)
FJ713390	SN3	Colombia	Rhodnius prolixus	D	(Falla et al., 2009)
FJ713391	SN5	Colombia	Rhodnius prolixus	A	(Falla et al., 2009)
FJ713392	SN8	Colombia	Rhodnius prolixus	A	(Falla et al., 2009)
FJ713395	SO6	Colombia	Rhodnius pallences	D	(Falla et al., 2009)
FJ713396	SO8	Colombia	Rhodnius pallences	-----	(Falla et al., 2009)
FJ713397	SP	Colombia	Humano	B	(Falla et al., 2009)
FJ713399	STP3.3	Colombia	Rhodnius pallences	B	(Cura et al., 2010)

EU626737	Td C	Colombia	Triatoma dimidiata	B	(Falla et al., 2009)
FJ713406	W3534	Colombia	Humano	-----	(Falla et al., 2009)
AM259472	X380	Colombia	-----	C	(Herrera et al., 2007)
GU179076	BG0811	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	A	(Cura et al., 2010)
GU179077	Flop2	Estados Unidos	Didhelfis virginiana	A	(O'Connor et al., 2007)
EF576837	Raccon70 cl2/(2)	Estados Unidos	Procyon lotor	A	(O'Connor et al., 2007)
GU179070	USA1	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
GU179072	USA104	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
GU179073	USA108	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
GU179074	USA111	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
GU179075	USA115	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
GU179071	USA28	Estados Unidos	Triatoma gerstaking	-----	(O'Connor et al., 2007)
FJ713405	VTH	Guinea Francesa	Humano	D	(Cura et al., 2010)
EF576824	Cari137 cl1/(a)	México	Triatoma sp	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576825	Cari137 cl2/(b)	México	Triatoma sp	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576826	Gue536 cl1/(a)	México	Triatoma longipennis	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576827	Gue536 cl2/(b)	México	Triatoma longipennis	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576845	H1cl1/(a)	México	Humano	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576846	H1 cl2/(b)	México	Humano	-----	(O'Connor et al., 2007)
FJ713374	HD	México	-----	A	(Cura et al., 2010)
*	INC10	México	-----	A	
EF576822	JJ0 cl1/(a)	México	Humano	A	(O'Connor et al., 2007)
EF576823	JJ0 cl2/(b)	México	Humano	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576828	L3033(a)	México	Triatoma longipennis	A	(O'Connor et al., 2007)
EF576829	L3033(b)	México	Triatoma longipennis	A	(O'Connor et al., 2007)
FJ713386	PG	México	-----	A	(Cura et al., 2010)
EF576835	Pla20 cl3/(c)	México	Triatoma picturata	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576847	Sba54 cl1/(a)	México	Triatoma barberi	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576848	Sba54 cl2/(b)	México	Triatoma barberi	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576819	Tep23cl1/(a)	México	Triatoma longipennis	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576821	Tep23cl14 cl14/(z)	México	Triatoma longipennis	-----	(O'Connor et al., 2007)
EF576820	Tep23 cl7/(g)	México	Triatoma longipennis	-----	(O'Connor et al., 2007)
FJ713403	TR	México	Triatoma sp	A	(Cura et al., 2010)
GU903132	Pan4 cl1	Panamá	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU903133	Pan4 cl4	Panamá	Humano	D	(Cura et al., 2010)
GU903134	Pan4 cl5	Panamá	Humano	A	(Cura et al., 2010)
GU903152	V305 Cl3	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU903153	V305 Cl6	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU903154	V305 Cl7	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU903148	V75 Cl1	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)

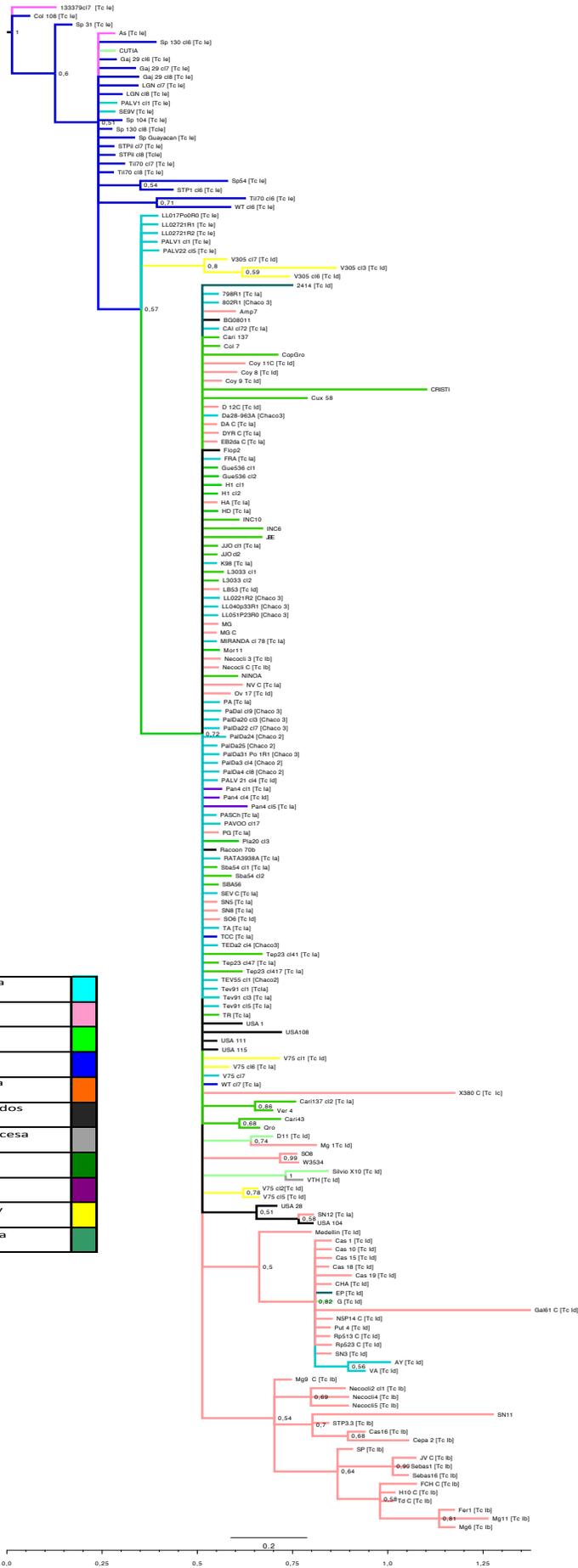
GU903149	V75 CI2	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU903150	V75 CI5	Paraguay	Triatoma infestans	D	(Cura et al., 2010)
GU903151	V75 CI6	Paraguay	Triatoma infestans	A	(Cura et al., 2010)
GU903123	2414	Venezuela	Humano	D	(Cura et al., 2010)
GU903126	EP	Venezuela	Humano	D	(Cura et al., 2010)

*Secuencia proporcionada por el M.C Ignacio Martínez Martínez

6.3.1 Análisis Bayesiano de las secuencias SL mini-exón

Para realizar el análisis Bayesiano, fue necesario buscar el mejor modelo de nucleótidos, el cual se ajustó de mejor forma a las secuencias de SL mini-exón. Este modelo se obtuvo gracias al programa Model Test 3.7 bajo el criterio de Akaike. El modelo más adecuado de acuerdo a este criterio, fue el modelo HKY+I+G, con una proporción de sitios invariantes de 0.3678 y una distribución Gamma de 0.3779. Con estos parámetros se realizó el análisis Bayesiano con el programa Mr. Bayes v 3.2.0, corrieron dos análisis independientes de inicio aleatorio con tres cadenas calientes y una fría durante 1000000 de generaciones muestreando cada 100 generaciones.

Al observar el árbol resultado del análisis Bayesiano, es posible observar que las cepas Mexicanas se agrupan en una sola rama que correspondía a las cepas Tc1 de otros países, las cuales han sido anteriormente caracterizadas como pertenecientes a los grupos genéticos Tc1 a, d y Chaco 2/3. A pesar de que es posible observar cierto agrupamiento por región geográfica, no se aprecian los agrupamientos entre cepas del mismo grupo genético, es decir existen en una sola rama cepas y clonas pertenecientes a diferentes grupos genéticos además de que no existe un buen soporte estadístico, ya que en su mayoría los valores de probabilidad posterior del árbol filogenético de SL mini-exón son menores a 0.75 (**Figura 6.8**).



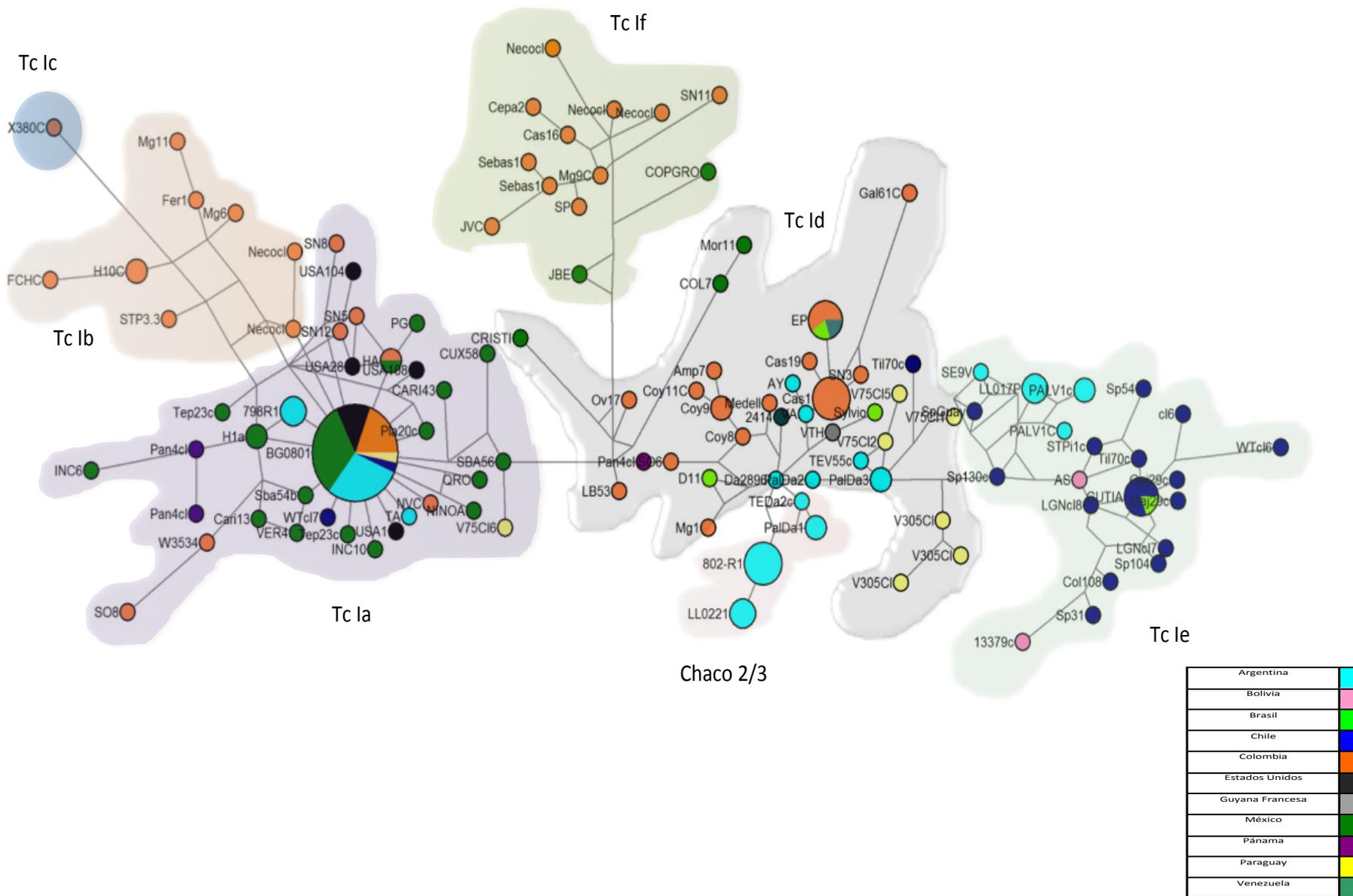
Argentina	■
Bolivia	■
Brasil	■
Chile	■
Colombia	■
Estados Unidos	■
Guyana Francesa	■
México	■
Panamá	■
Paraguay	■
Venezuela	■

Figura 6.8. *Árbol filogenético de SL mini-exón de 176 cepas y clonas Tc I de diferentes países de Latinoamérica.* La historia evolutiva se obtuvo gracias a un análisis Bayesiano, en el cual se utilizó el modelo HKY+I+G con una proporción de sitios invariantes de 0.3678 y una distribución Gamma de 0.3779. Los colores representan el origen de las cepas y clonas. En el árbol es posible observar que las cepas de origen Mexicano se agrupan en una sola rama, en la cual se agrupan cepas y clonas de otros países pertenecientes al grupo genético Tc Ia, Tc Id y el grupo Chaco 2/3. Al lado del nombre de cada cepa o clona anteriormente reportada se indica el grupo genético al cual pertenecen. Abajo del árbol filogenético se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.3.2 Análisis de red Median Joining (MJ) de SL mini-exón

Debido a que el análisis Bayesiano no tenía buen soporte estadístico, se decidió realizar un análisis de red Median Joining, el cual cuenta con mayor sensibilidad, ya que es capaz de discriminar una sola mutación, para ello se creó una red Median Joining (MJ) utilizando toda la secuencia de SL mini-exón. En esta red se incluyeron cepas y clonas de los diversos subgrupos genéticos de TcI.

Con este análisis fue posible observar que la mayor parte de las cepas mexicanas se agruparon con cepas y clonas pertenecientes al grupo genético Tc Ia. Las cepas CopGro, JBE, Mor 11, Col 7 y CRISTI, se encontraron asociadas a cepas y clonas que anteriormente se habían clasificado como pertenecientes a los a los grupos genéticos Tc Ib y Tc Id. Algo interesante fue que las cepas y clonas anteriormente descritas en el grupo genético Tc Ib se agruparon en dos grupos diferentes, uno relacionado con cepas y clonas Tc Ia y Tc Ie, al cual seguimos denominando Tc Ib; y el otro grupo se encontró relacionado con las cepas mexicanas JBE y CopGro, al cual denominamos Tc If (**Figura 6.9**).



anteriormente se consideraban pertenecientes al grupo Tc Ib, uno de ellos se encuentra relacionado con los grupo genéticos Tc le y Tc Ia, al cual seguimos denominamos Tc Ib, ya que mantiene las mismas relaciones entre los grupos genéticos que el anterior grupo genético descrito como Tc Ib; mientras que el otro grupo genético está asociado a las cepas mexicanas JBE y CopGro, al cual denominamos grupo Tc If. Las cepas mexicanas Col 7, CRISTI, Mor11 siguieron agrupándose con las cepas y clonas pertenecientes al grupo Tc Id (Figura 6.11).

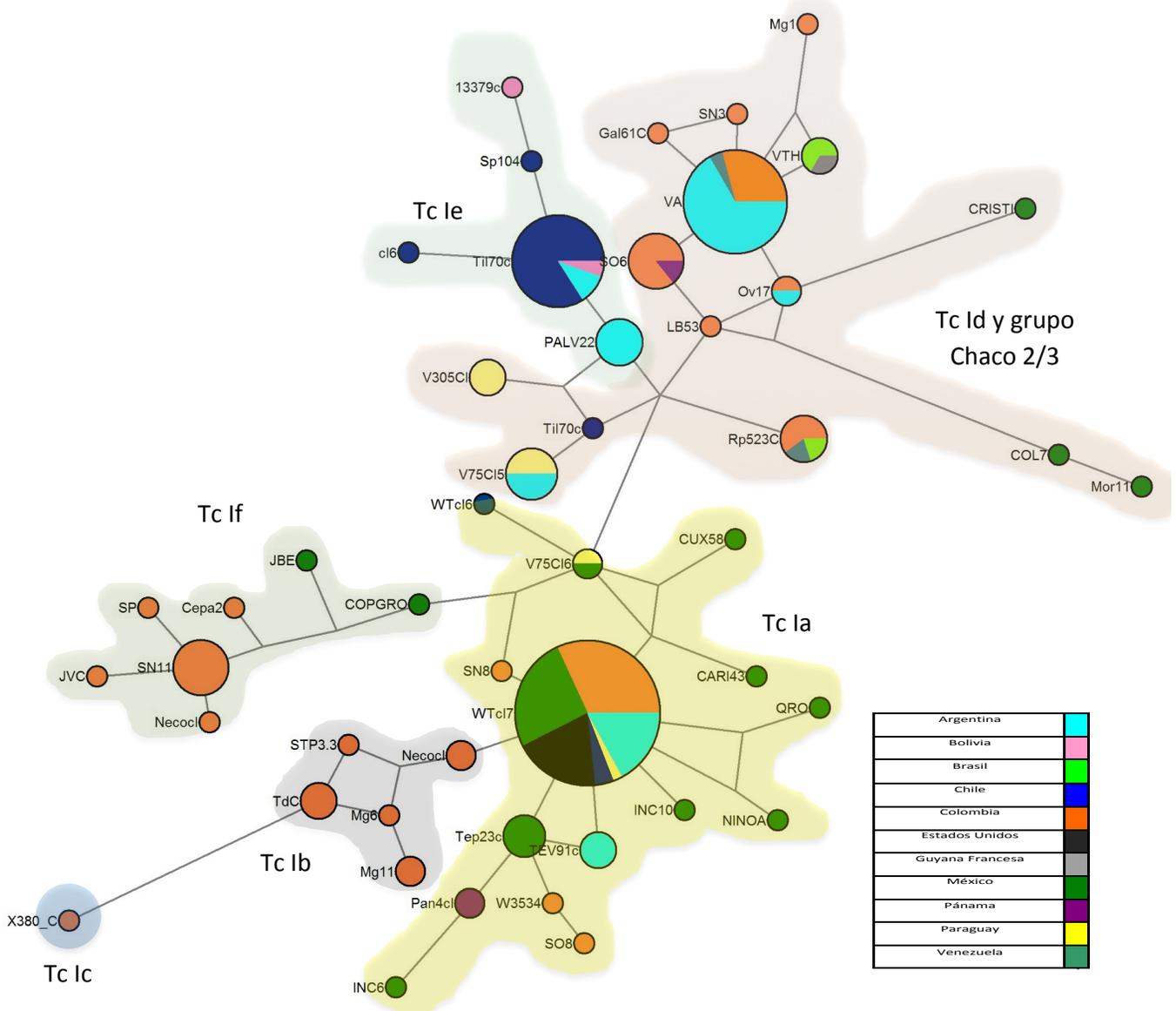
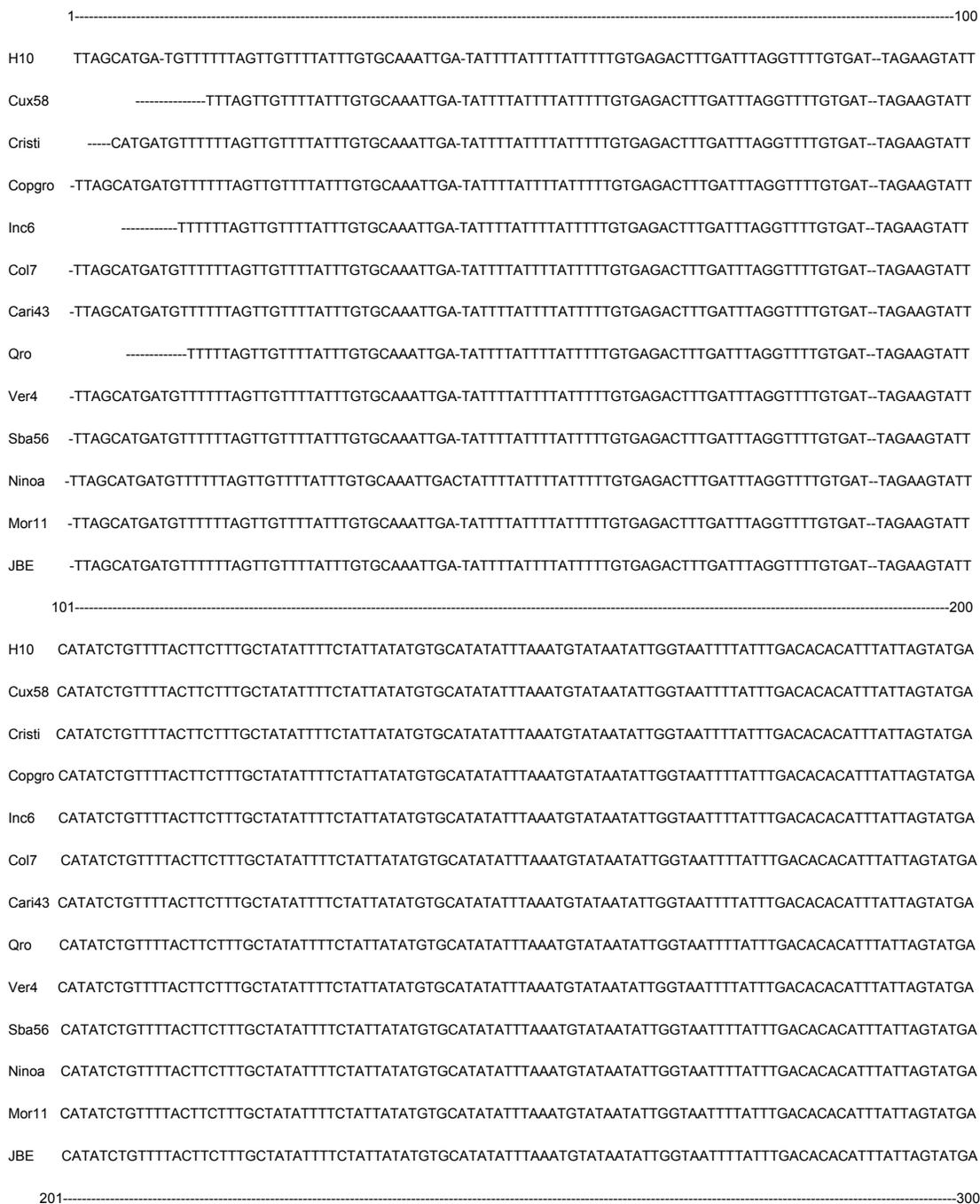


Figura 6.11. Red Filogenética MJ de SL-IR mini-exón de 176 cepas y clonas Tc I de *Trypanosoma cruzi* de diferentes países de América. En esta red se incluyeron cepas y clonas de los diversos grupos genéticos ya descritos. Es posible observar que la mayor parte de las cepas mexicanas se agrupan con las cepas y clonas pertenecientes al grupo Tc Ia. Las cepas mexicanas JBE, CopGro, se encuentran relacionadas a cepas y clonas del grupo Tc Ib, mientras que las cepas CRISTI, Col 7 y Mor11 se encuentran relacionadas con las cepas y clonas pertenecientes al grupo Tc Id. El

tamaño de los nodos es proporcional al número de individuos que presentan la misma secuencia. La distancia entre cada nodo es proporcional al número de sustituciones.

6.4.0 Análisis filogenético del gen mitocondrial de citocromo B

Las trece secuencias de citocromo B mitocondrial pertenecientes a las cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* Tc I, fueron analizadas por medio del programa Mega 5. En dicho análisis se encontró que 872 sitios de 904 sitios eran conservados, mientras que 12 sitios eran variables, de los cuales ninguno resulto informativo al únicamente analizar las secuencias de cepas representativas mexicanas (figura 6.12).



JBE CTTCATGTATTACATGTCTTGCT-CCCTTT--TGTTTAATTATGG-TATTATTTTGCATCTTTTTGTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGCTT

501-----600

H10 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Cux58 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Cristi TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Copgro TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Inc6 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Col7 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Cari43 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Qro TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Ver4 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Sba56 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

NinoA TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

Mor11 TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

JBE TTTGTGAT-AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTTGCAATTTTCATATTATTTGTGT-

601-----700

H10 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Cux58 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Cristi AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Copgro AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Inc6 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Col7 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Cari43 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Qro AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Ver4 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Sba56 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

NinoA AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

Mor11 AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

JBE AATATATGTTATTTTATAAATTGATATTTTGTTCATGAAGAATCTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGAT-AAAATATTACCTGAAT

701-----800

H10 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Cux58 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Cristi GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Copgro GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Inc6 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Col7 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Cari43 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Qro GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

Ver4 GATTTTTCCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT

```

Sba56 GATTTTCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT
Ninoa GATTTTCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT
Mor11 GATTTTCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT
JBE GATTTTCTATTCTATTGGTTTCCTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATT-TCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGCTATTTATGTTT
801-----900
H10 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTG---
Cux58 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
Cristi ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
Coppgro ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTG---
Inc6 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTG----
Col7 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTG---
Cari43 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTG---
Qro ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
Ver4 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
Sba56 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
Ninoa ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGGT---
Mor11 ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
JBE ATATTA AATTGCATATTATGGTTTGTATATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCGTTGATTCTATTTATAGTATATGAATGAGTGTTT
901-----913
H10 -----
Cux58 TTAG-----
Cristi TTAG-----
Coppgro -----
Inc6 -----
Col7 -----
Cari43 -----
Qro TTAG-----
Ver4 TTAGCTTATACG-
Sba56 TTAG-----
Ninoa -----
Mor11 TTAGC-----
JBE TTAGCTTATACG

```

Figura 6.12 Alineamiento del gen mitocondrial de citocromo B de cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* pertenecientes al DTU Tcl. El alineamiento se encuentra en formato Nexus, es posible observar una gran homogeneidad.

Las 13 secuencias mexicanas de citocromo B mitocondrial de cepas mexicanas Tcl se integraron a un alineamiento en el cual se contaban con 76 secuencias pertenecientes a clonas de *T. cruzi* Tcl de Colombia (70) y Chile (6) obtenidas de la base de datos del Genbank (**Tabla 6.5**).

Tabla 6.5 Secuencias de citocromo B mitocondrial extraídas del Gen Bank

Clave Gen Bank	Clona o Cepa	Origen Geográfico	Origen Biológico	Genotipo citocromo B reportado	Referencia
EU559323	A04	Chile	<i>Mepraia spinolai</i>	IA	(Spotorno et al., 2008)
EU559324	24t.p18	Chile	Cabra	IA	(Spotorno et al., 2008)
EU559326	26t.p18	Chile	Cabra	IB	(Spotorno et al., 2008)
EU559327	58.p18	Chile	<i>Octodon</i>	IB	(Spotorno et al., 2008)
EU559328	54.p18	Chile	<i>Octodon</i>	IB	(Spotorno et al., 2008)
EU559329	5.p18	Chile	Cabra	IB	(Spotorno et al., 2008)
HQ713679	D18cl10	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713680	D16cl8	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713681	YDm1Bcl3	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713682	YAS1cl2	Colombia	<i>Alouatta sp.</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713683	SLDm1cl9	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713684	SLDm2cl10	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713685	NR1cl10	Colombia	<i>Ratus ratus</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713686	NDm1cl7	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713687	SR2cl7	Colombia	Roedor	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713688	AADm1cl1	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713689	Gal61cl16	Colombia	Roedor	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713690	YDm1Mcl2	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713691	YTT1cl1	Colombia	<i>Tamandua tetradactyla</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713692	Dm11cl7	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713693	Dm38cl16	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713694	D5cl7	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713695	Dm7cl6	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713696	D1cl14	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	C	(Ramirez et al., 2011)
HQ713697	AAC1cl3	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713698	AAD6cl7	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713699	YD1cl5	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713700	YB1cl2	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713701	X1544cl10	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713702	X1082cl9	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713703	X236cl8	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713704	SLA9cl9	Colombia	Humano	A	(Ramirez et al., 2011)
HQ713705	SLB3cl2	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713706	SLD2cl1	Colombia	<i>Eratyrus cuspidatus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713707	AAB3cl2	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)
HQ713708	SLF5cl10	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramirez et al., 2011)

HQ713709	Cepa2cl6	Colombia	Roedor	C	(Ramírez et al., 2011)
HQ713710	Palmascl7	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713711	Necoclicl6	Colombia	<i>Rhodnius pallescens</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713712	NB2cl15	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713713	NA3cl4	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713714	NC2cl9	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713715	N5P14cl17	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713716	RP540Cl9	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713717	DYRcl15	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713718	LCVcl3	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713719	Xchcl13	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713720	JEMcl2	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713721	SEVcl8	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713722	FECcl15	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713723	YLYcl12	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713724	CACQcl14	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713725	LJVPcl7	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713726	EMcl13	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713727	EEBBcl10	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713728	EHcl1	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713729	CGcl16	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713730	DAcl14	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713731	SMAcl8	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713732	MGcl15	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713733	LERcl3	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713734	Fchcl13	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713735	SPcl11	Colombia	Humano	A	(Ramírez et al., 2011)
HQ713736	SN5cl7	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713737	Coy11cl15	Colombia	<i>Rhodnius colombiensis</i>	C	(Ramírez et al., 2011)
HQ713738	AAA7cl15	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713739	X380cl23	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713740	SLD1Ecccl6	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713741	TmPA1cl6	Colombia	<i>Triatoma maculata</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713742	TVcl9	Colombia	<i>Triatoma venosa</i>	D	(Ramírez et al., 2011)
HQ713743	Tdcl9	Colombia	<i>Triatoma dimidiata</i>	B	(Ramírez et al., 2011)
HQ713744	Td2cl10	Colombia		B	(Ramírez et al., 2011)
HQ713745	Td11cl7	Colombia	<i>Triatoma dimidiata</i>	B	(Ramírez et al., 2011)
HQ713746	AACf1cl2	Colombia	<i>Canis familiaris</i>	B	(Ramírez et al., 2011)
HQ713747	H10cl10	Colombia	<i>Canis familiaris</i>	B	(Ramírez et al., 2011)
HQ713748	SN10cl3	Colombia		B	(Ramírez et al., 2011)

En un principio se deseaba analizar un fragmento de 950 pb, con lo cual se pretendía obtener mayor información, pero debido a que en Genbank no se encontraron secuencias del gen mitocondrial de citocromo B mayores a 550 pb y al secuenciar y al comparar las secuencias de cepas mexicanas no existía diferencia en la región de 550 a 950 pb, se decidió únicamente tomar en cuenta la región homologa de 550 pb, dando como resultado un fragmento de 439 pb, ya que el primer D tiene aproximadamente a 100pb su punto de unión a comparación del primer p18, con el cual se obtiene el fragmento de 550pb .

6.4.1 Análisis Bayesiano de fragmento de gen citocromo B mitocondrial

Se realizó un análisis Bayesiano utilizando el programa Mr. Bayes v 3.2.0, para determinar qué modelo de nucleótidos se ajustaba de mejor forma a nuestras secuencias de citocromo B, se utilizó el programa Model Test, de acuerdo a este análisis, el modelo que representa de mejor forma nuestras secuencias de citocromo B es el modelo GTR+G con una distribución gama de 0.7044. En este análisis se utilizó como grupo externo una secuencia de *T. marinkellei*.

El resultado final del análisis Bayesiano es un árbol filogenético donde se pueden identificar 2 grupos genéticos principales, el grupo 1, el cual agrupa las clonas colombianas pertenecientes al grupo genético A de acuerdo a la clasificación dada a partir del análisis del gen mitocondrial de citocromo B; el grupo 2 el cual esta conformado por 4 subgrupos, el subgrupo de los no agrupados y los subgrupos 2.1, 2.2 y 2.3. El subgrupo de los no agrupados está representado por las cepas Mexicanas y las clonas colombianas que anteriormente se habían clasificado en los grupos genéticos B, D y C; el subgrupo 2.1 esta representado por el grupo genético conformado por cuatro clonas de origen chileno las cuales se habían clasificado anteriormente como el grupo Tc IB; el subgrupo 2.2 está conformado por dos clonas chilenas que anterior se habían clasificado como el grupo Tc IA, y finalmente el subgrupo 2.3 esta conformado por 4 clonas colombianas, las cuales se habían clasificado en el grupo D (**figura 6.13**).

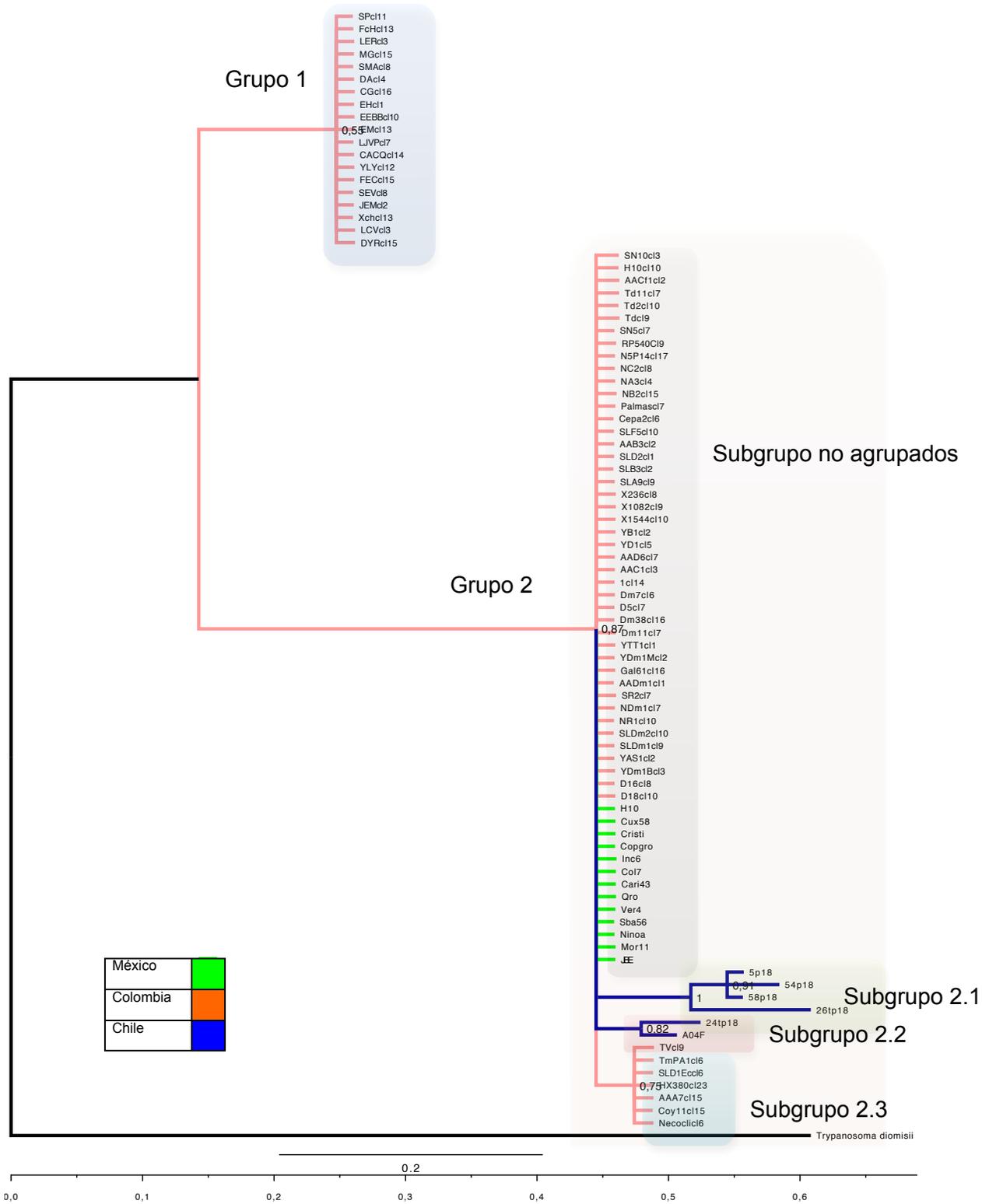


Figura 6.13. Árbol filogenético del gen mitocondrial de citocromo B de 80 cepas y clones de *T. cruzi* TcI. En este árbol es posible distinguir dos grupos genéticos principales. El grupo 1 está conformado por clones colombianos anteriormente descritas como pertenecientes al grupo genético A, mientras que el grupo 2 esta conformado por cuatro diferentes subgrupos, el subgrupo de los no agrupados y los subgrupos 2.1, 2.2 y 2.3. En el subgrupo de los no agrupados se encuentran las cepas mexicanas, al igual que clones colombianos anteriormente descritas en los grupos genéticos B, C y D. El subgrupo genético 2.1 está conformado por cuatro cepas chilenas anteriormente descritas en el genotipo Tc IB, mientras que el subgrupo 2.2 está conformado por dos cepas chilenas anteriormente descritas en el genotipo Tc IA,

finalmente el subgrupo 2.3 está conformado por clonas colombianas anteriormente descritas en el genotipo D. Abajo del árbol filogenético se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.4.2 Análisis de red Median Joining de fragmento del gen citocromo B mitocondrial

Debido a que las clonas colombianas que anteriormente eran descritas en los grupo genéticos B, C y parte del D se contraen en el grupo 2 en el subgrupo de los no agrupados al realizar el análisis Bayesiano, se construyó una red Median Joining, ya que este tipo de análisis cuenta con mayor sensibilidad. El resultado de este análisis, es una red filogenética en la cual es posible distinguir 7 grupos genéticos, de los cuales seis, los genotipos encontrados en las cepas chilenas, denominados Tc IB, Tc IA; y los genotipos colombianos denominados A, B, C y D. Adicionalmente se logró distinguir un genotipo donde se encuentran las cepas mexicanas, al cual denominamos como genotipo de cepas mexicanas (**Figura 6.14**).

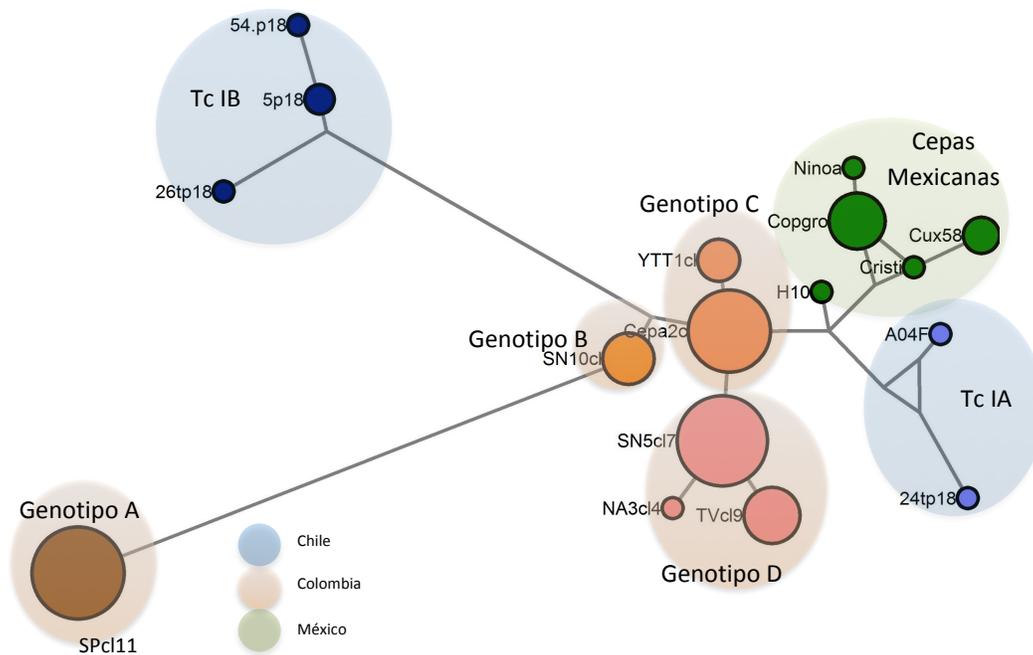


Figura 6.14. Red Filogenética MJ de 80 cepas de *T. cruzi* TcI. En la red filogenética es posible distinguir siete grupos genéticos, seis de los cuales ya se habían descrito, es decir los dos genotipos Tc IA y Tc IB y los genotipos A, B, C y D, adicionalmente es posible distinguir un séptimo genotipo el cual agrupa a las cepas mexicanas.

6.5.0 Análisis conjunto de los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial

Se extrajeron del Gen Bank secuencias de 14 cepas y clonas colombianas de *T. cruzi* TcI de los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial. Debido a que no se encontraron las secuencias de las clonas seleccionadas de SL mini-exón se usaron las secuencias de las cepas a las cuales pertenecían (**Tabla 6.8**)

Tabla 6.8 Secuencias de cepas y clonas colombianas de *Trypanosoma cruzi* Tc I extraídas del Gen Bank de SL mini-exón y citocromo B mitocondrial

Cepa/clona	Genotipo SL mini-exón (cepa)	Genotipo Citocromo B (clona)
Cepa2cl6	Tc lf	2
Coy11cl16	Tc ld	5
DA	Tc lb	1
DYRcl15	Tc lb	1
FcHcl13	Tc lb	1
Gal61cl16	Tc ld	2
H10cl10	Tc lb	2
MGcl15	Tc lb	1
N5P14cl17	Tc ld	2
Necoclicl6	Tc lf	5
SEVcl8	Tc lb	1
SN5cl7	Tc ld	2
SPcl11	Tc lf	1
Tdcl9	Tc lb	2

6.5.1 Análisis Bayesiano de conjunto de los genes: SL mini-exón y fragmento de citocromo B mitocondrial

Se realizó un análisis en el cual se combinaron en un mismo árbol filogenético los dos genes estudiados: gen mitocondrial de citocromo B y SL mini-exón; para ello se realizó un análisis Bayesiano a 27 cepas y clonas de *T. cruzi* Tc I (13 cepas mexicanas y 14 cepas colombianas), debido a que cada gen cuenta con diferente tasa evolutiva, el análisis se compartamentalizó, es decir de la base 1 a la base 438 nucleótido (gen mitocondrial citocromo B) se analizó con el modelo GTR+G con una distribución gama de 0.7044 y de la base 439 a la base 702 se analizó con el modelo HKY+I+G, con una proporción de sitios invariantes de 0.3678 y una distribución Gamma de 0.3779.

Al analizar el árbol filogenético resultado del análisis Bayesiano integrando los dos genes, es posible distinguir dos grupos genéticos principales, el genotipo 1 y el genotipo 2. El genotipo 1 esta integrado por las clonas pertenecientes grupo genético 1 de citocromo B, mientras que el genotipo 2 corresponde a cepas y clonas pertenecientes al grupo genético 2 de citocromo B. También es posible observar que las distancias genéticas entre las cepas y clonas pertenecientes al genotipo 2 son pequeñas. Todas las cepas mexicanas se agrupan en una sola rama en el genotipo 2 (**Figura 6.15**).

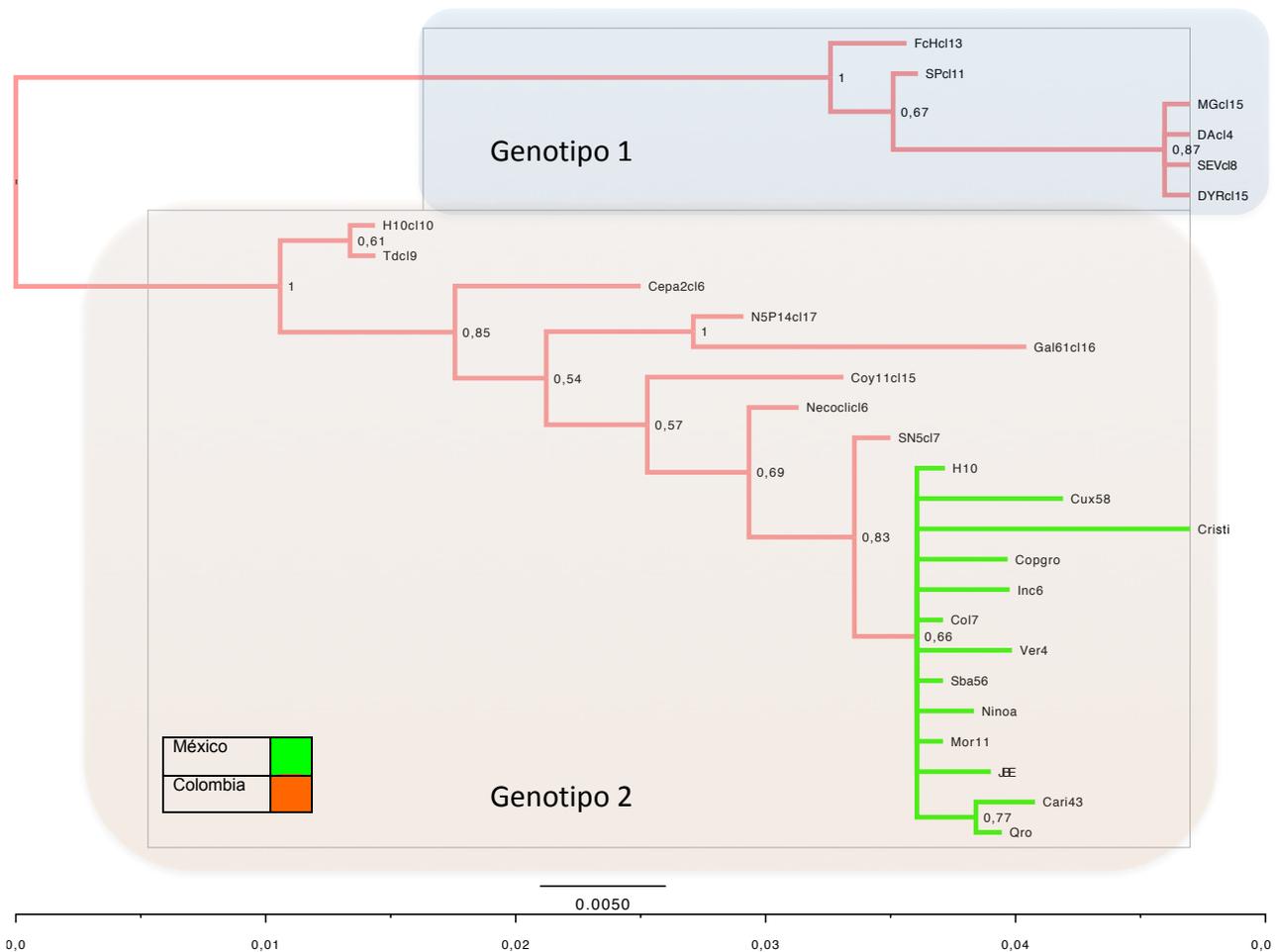


Figura 6.15. *Árbol suma en el cual se analizan los genes SL- mini-exón y el fragmento del gen mitocondrial de citocromo B.* Las cepas y clonas analizadas se agrupan en dos ramas principales, una en la cual se agrupan las clonas pertenecientes al genotipo 1 de citocromo B y en la otra rama se agrupan las demás cepas y clonas, las cuales denominamos como genotipo 2. Es posible observar que las cepas mexicanas pertenecen al genotipo 2. Abajo del árbol filogenético se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.6.0 Integración de todos los resultados del análisis de las cepas TcI

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados a las cepas mexicanas TcI, es posible observar que de acuerdo al marcador molecular utilizado, se observa variación genética ó no (**Tabla 6.9**).

Tabla 6.9 Resumen de resultados obtenidos con los diferentes marcadores moleculares

Cepa	Origen Biológico	Genotipo SCLE 1-2	Genotipo Análisis Red MJ SL-IR mini-exón	Genotipo Análisis Bayesiano citocromo B	Genotipo Análisis de Red MJ de citocromo B	Genotipo Análisis Bayesiano Árbol suma : citocromo B /SL mini-exón
Cari 043	<i>T. picturata</i>	Patrón de bandeó tipo A	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Col 07	<i>T. pallidipennis</i>	Patrón de bandeó tipo B	D	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
CopGro	<i>T. mazzotti</i>	Patrón de bandeó tipo B	B	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2

CRISTI	Humano	Patrón de bandeo tipo B	D	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Cux 58	<i>T. longipennis</i>	Patrón de bandeo tipo B	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
H 10	Humano	Patrón de bandeo tipo A	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
INC 6	Humano	Patrón de bandeo tipo B	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
JBE	Humano	Patrón de bandeo tipo A	B	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Mor 011	<i>D. virginiana</i>	Patrón de bandeo tipo B	D	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Ninoa	Humano	Patrón de bandeo tipo A	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Qro	<i>T. sp.</i>	Patrón de bandeo tipo A	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
Sba 58	<i>T. barberi</i>	Patrón de bandeo tipo B	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2
VER 004	<i>D. marsupialis</i>	Patrón de bandeo tipo B	A	2 subgrupo no agrupados	Mexicanas	2

6.7.0 Análisis Filogenético de cepas No TcI

Se realizó un análisis filogenético de las cepas Ver 1 y Ver 6. Para ello se realizó un análisis Bayesiano de los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondria, al igual que un análisis de red MJ al gen mitocondrial de citocromo B.

6.7.1 Análisis Bayesiano gen SL mini-exón de cepas no TcI

Las cepas Ver 1 y Ver 6 son cepas las cuales no pertenecen al grupo genético TcI, ya que al realizar la amplificación del gen SL mini-exón el amplificado fue de 300pb, por tanto los productos de amplificación de SL mini-exón fueron secuenciados (**Figura 6.16**). Las secuencias obtenidas se alinearon en un alineamiento que contaba con al menos una secuencia de SL mini-exón de cada DTU. Para representar el DTU TcI se usaron como cepas referencia las cepas mexicanas representativas TcI, como cepa representativa del DTU TcII se usó Tul8, en el caso del DTU TcIII se ocuparon como cepas representativas las cepas M5631 y M6241, del DTU TcIV la cepa representativa fue Can TcIII, mientras que la referencia del DTU TcV fue la cepa MN y finalmente la cepa referencia del DTU TcIV fue CI Brener (**Tabla 6.10**).

```

1-----100
Ver 1 GTGTCTGCCACCT-CCTT-GGGTC-GCCCTCATTTTCGCTTCATGGCTG-CTATTGCCTGCATCTTT-GTTT-TGTTTT-GT---GTTTT-CTCC
Ver 6 GTGTCCGCCACCT-CCTT-CGGGC-CCCCTCATTTTCGCTTCATGGCTG-CTATTGCCTGCATCTTT-GTTT-TGTTTT-GT---GTTTT-CTCC

101-----200
Ver 1 --G-TCTC-GTTCCTTT-T---ATTCGC-CTTTTT-TCCGCGT--ATG--CC-GCGCTTCTTCC--TGTGTTTT-CCGGTGTTTTT--GCC--
Ver 6 --G-TCTC-GATCCTTT-T---ATTCGC-CTTTTT-TCCGCGT--ATG--CC-GCGCTTCTTCC--TGTGTTTT-CCGGTGTTTTT--GCC--

201-----300
Ver 1 TTGCT--CG-CAC-ACTCGGCT-----GCATTTGC--TGTTCCCACTC--GCCA--TGTGC-GTCT-TTTCC-G-----CC
Ver 6 TTGCT--CG-CAC-ACTCGGCT-----GCATTTGC--TGTTCCCACTC--GCCA--TGTGC-GTCT-TTTCC-G-----CC

```

Ver 1 CCC-TG-AC-GCCGTCCACGGCGC---T-----ATCCCAGGGCCGACG--TCCCAGACCTG----AC--CCC---TCCCCAGTGTGGCCTGGG-AGGG

Ver 6 CCC-TG-AC-GCCGTCCACGGCGC---T-----ATCCCAGGGCCGACG--TCCCAGACCTG----AC--CCC---TCCCCAGTGTGGCCTGGG-AGGG

400---404

Ver 1 GGGA

Ver 6 GGGA

Figura 6.16 Alineamiento del gen SL mini-exón de cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* no Tc I. El alineamiento se encuentra en formato Nexus, es posible observar una gran homogeneidad.

Tabla 6.10 Secuencias referencia del gen SL mini-exón No TcI

Clave Gen Bank	Cepas Referencia	DTU
AY367125	*Tu18	TcII
AF050521	*M5631	TcIII
AF050522	*M6241	TcIII
AY367123	*Can III	TcIV
AY367128	*MN	TcV
AF506368	*Cl Brener	TcVI

* Referencias (Zingales et al., 2009), como referencia del DTU Tc I se usaron las cepas mexicanas.

Para realizar el análisis Bayesiano, fue necesario buscar el mejor modelo de nucleótidos, el cual se ajustó de mejor forma a las secuencias de SL mini-exón. Este modelo se obtuvo gracias al programa Model Test 3.7 bajo el criterio de Akaike. El modelo más adecuado de acuerdo a este criterio, fue el modelo HKY+I+G, con una proporción de sitios invariantes de 0.3678 y una distribución Gamma de 0.3779. Con estos parámetros se realizó el análisis Bayesiano con el programa Mr. Bayes v 3.2.0, corrieron dos análisis independientes de inicio aleatorio con tres cadenas calientes y una fría durante 1000000 de generaciones muestreando cada 100 generaciones.

Al observar el árbol resultado del análisis Bayesiano, se pudo distinguir cuatro grupos genéticos, uno correspondiente a las cepas TcI; el segundo grupo correspondiente a las cepas TcII, TcV y TcVI; el tercer grupo genético correspondiente a las cepas TcIII y finalmente el cuarto grupo correspondiente a las cepas pertenecientes a TcIV. Las cepas mexicanas no TcI se agruparon con las cepas referencia Cl Brener (DTU TcVI), MN (DTU TcV) y Tu18 (DTU TcII) (**Figura 6.17**).

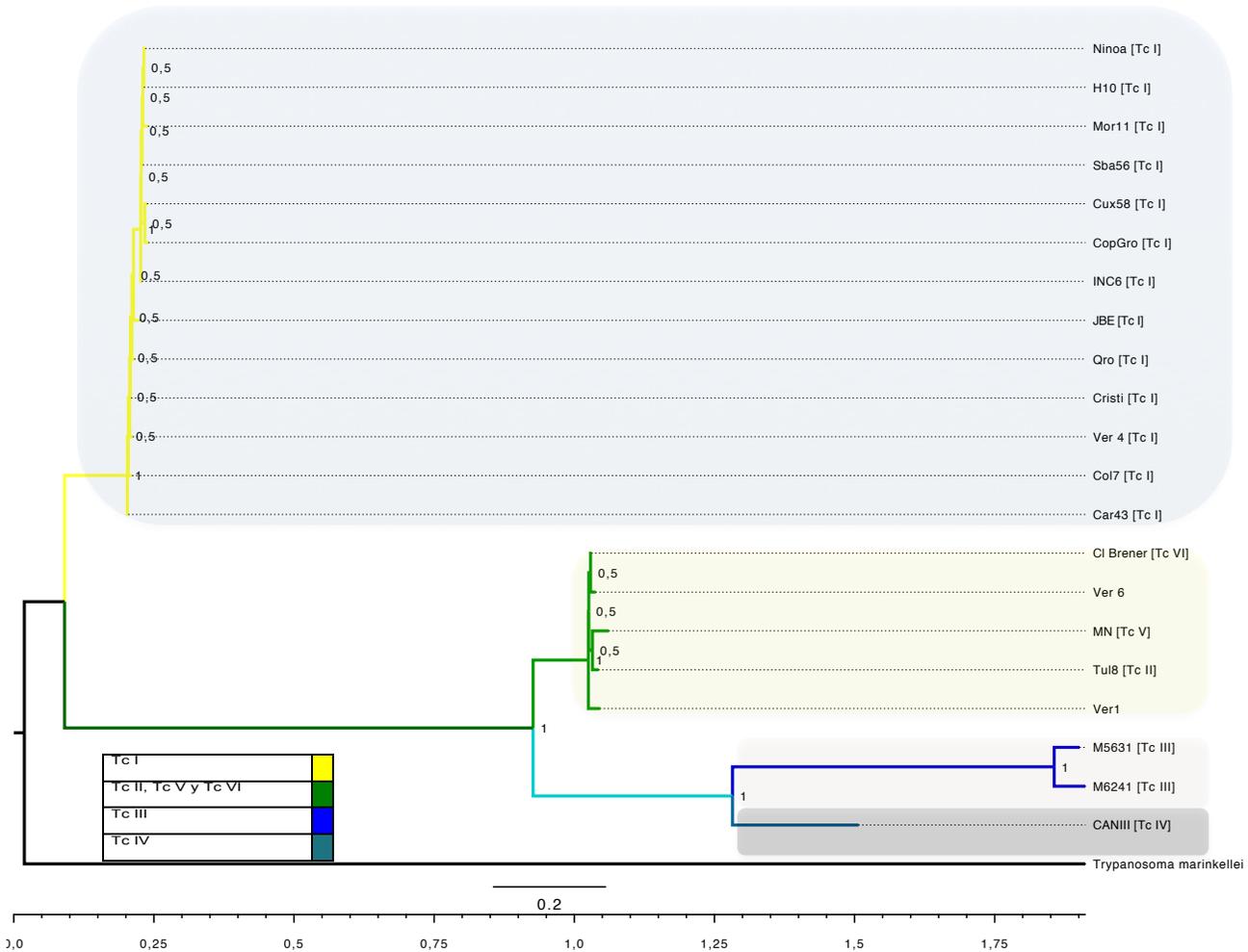


Figura 6.17

Árbol filogenético analizando el gen *SL mini-exón* cepas mexicanas no *TcI*. En este árbol es posible distinguir cuatro grupos genéticos, el primero corresponde a cepas *TcI*; el segundo a las cepas *TcII*, *TcV* y *TcVI*; el tercero *TcIII* y el cuarto a *Tc IV*. Las cepas mexicanas no *TcI* se agrupan en el segundo grupo genético, es decir con las cepas referencia pertenecientes a los DTUs *TcII*, *TcV* y *TcVI*. Abajo del árbol filogenético se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.7.2 Análisis filogenético de citocromo B mitocondrial del cepas mexicanas no *Tc I*

Las secuencias de citocromo B mitocondrial de las cepas Ver 1 y Ver 6 fueron analizadas por medio del programa Mega 5, en este análisis fue posible observar que las cepas Ver 1 y Ver 6 son muy similares, ya que de 872 sitios 826 son iguales encontrándose 5 sitios variantes únicamente (**Figura 6.18**). Es importante resaltar que al igual que en el análisis del gen mitocondrial de citocromo B de las cepas *TcI*, se analizó únicamente el fragmento homólogo de 550 pb, el cual en este caso tiene una longitud de 439 pb.

```

1-----100
Ver6 TTAGCGTGTAGTTTTAGTTGTTTTATTGTGCAA-TTGATATTTATTTATTTTGTGAGATTTTGATTTAGGTTTTGTAATTAGAAGTATTCATA
Ver1 ---CGTGTAGTTTTAGTTGTTTTATTGTGCAAATTGATATTTATTTATTTTGTGAGATTTTGATTTAGGTTTTGTAATTAGAAGTATTCATA
101-----200
Ver6 TTTGTTTCACITCCTTATTATATTTTTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATAATATTGGTAATTTATTCGACACACATTTATTAGTGTGATTTG
Ver1 TTTGTTTCACITCCTTATTATATTTTTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATAATATTGGTAATTTATTCGACACACATTTATTAGTGTGATTTG

```

```

201-----300
Ver6 TAGGATTGTATTATTATGTTTCATAATAGTTATTGCATTATTGGATATGTGTTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTA
Ver1 TAGGATTGTATTATTATGTTTCATAATAGTTATTGCATTATTGGATATGTGTTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTA
301-----400
Ver6 ATATTTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTGAGTATTGTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACTTCACGTAT
Ver1 ATATTTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTGAGTATTGTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTTTTAAAACTTCACGTAT
401-----500
Ver6 TACACGTTCTACTTCCTTTGTATTAATAATGGTATTATTTTGCATCTTTTGTGTTACATTATTTATGAGTTCAGATGCTTTTGTGATAGGTTTG
Ver1 TACACGTTCTACTTCCTTTGTATTAATAATGGTATTATTTTGCATCTTTTGTGTTACATTATTTATGAGTTCAGATGCTTTTGTGATAGGTTTG
501-----600
Ver6 CTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTCGCATTTTTCATATTATTTGTGTAATGTACGTTATTTTTA
Ver1 CTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTGTATGTGATTTTATTGAGAGATATGTTTCTCGCATTTTTCATATTATTTGTGTAATGTACGTTATTTTTA
601-----700
Ver6 TAAATTGATATTTTCGTTTTCCATGAAGAATCTTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGATAAAAATATTACCCGAATGATTTTTCCTATTTTTAT
Ver1 TAAATTGATATTTTCGTTTTCCATGAAGAATCTTGGGTCATTGTTGATACATTA AAAACATCCGATAAAAATATTACCCGAATGATTTTTCCTATTTTTAT
701-----800
Ver6 TTGGCTTCCTAAAGCAGTGCCTGACAAATTTATGGGATTATTTTGTGAGTACTATTATTCGCATTATTTATGTTTATATTAGATTGCATATTGT
Ver1 TTGGCTTCCTAAAGCAGTGCCTGACAAATTTATGGGATTATTTTGTGAGTACTATTATTCGCATTATTTATGTTTATATTAAATTGCATATTGT
801-----881
Ver6 GATTGTTTATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAGCGTGTTCG-----
Ver1 GATTGTTTATTGCAGAAGTCTTTATTATGATTAACATATTCATTGATTCTATTCTATAGTATATGAATGAGTGGTTTT

```

Figura 6.18 Alineamiento del fragmento del gen citocromo B mitocondrial de cepas mexicanas representativas de *T. cruzi* no Tc I. El alineamiento se encuentra en formato Nexus, es posible observar una gran homogeneidad.

Para la realización del análisis bayesiano, así como el análisis de redes las secuencias de citocromo B mitocondrial de las cepas mexicanas no TcI, Ver I y Ver 6 fueron alineadas con 15 secuencias de citocromo B de cepas referencia de cada DTU (*Zingales et al. 2009*) (Tabla 6.11), así como con las 13 secuencias de citocromo B mitocondrial de cepas mexicanas representativas pertenecientes al DTU TcI.

Tabla 6.11 Secuencias referencia de citocromo B mitocondrial

Clave Gen Bank	Clona o cepa referencia	DTU
AJ130931	*Esmeraldo03	TcII
AJ130932	*TU18cl2	TcII
FJ168768	*Y	TcII
AJ130929	*CanIIIcl1	TcIV
AJ439720	*M5631	TcIII
AJ439725	*92.80	TcV
AJ130935	*Cl Brener	TcVI
AJ130933	*M6241cl6	TcIII
AJ130934	*MNcl2	TcV
AJ130936	*Tulahuenc12	TcVI
AJ439726	*X109/2	TcIII
AJ439723	*X57	TcVI
AJ439719	*Cuica	TcI
FJ156759	*G	TcI
AJ130928	*X10cl1	TcI

*Secuencias referencia (Zingales et al. 2009)

6.7.2.1 Análisis Bayesiano del gen de citocromo B mitocondrial de cepas mexicanas no TcI

Debido a que las cepas mexicanas Ver 6 y Ver 1 no pertenecen al DTU TcI se realizó un análisis Bayesiano usando el modelo GTR+G con una distribución gama de 0.7044. En este análisis se utilizó como grupo externo, el cual fue *T. marinkellei*. El resultado de el análisis fue un árbol, en el cual existían tres grupos genéticos: el primer grupo genético pertenece a los aislados DTU Tc I, el segundo grupo genético pertenece a los aislados pertenecientes a los DTUs híbridos DTUs III-VI, mientras el tercer grupo genético pertenece a los aislados pertenecientes al DTU Tc II. Las cepas mexicanas representativas TcI se agruparon con cepas y clonas referencia TcI, mientras que las cepas mexicanas Ver 1 y Ver 6, se agruparon con los DTUs híbridos, es decir TcIII-VI (**figura 6.19**).

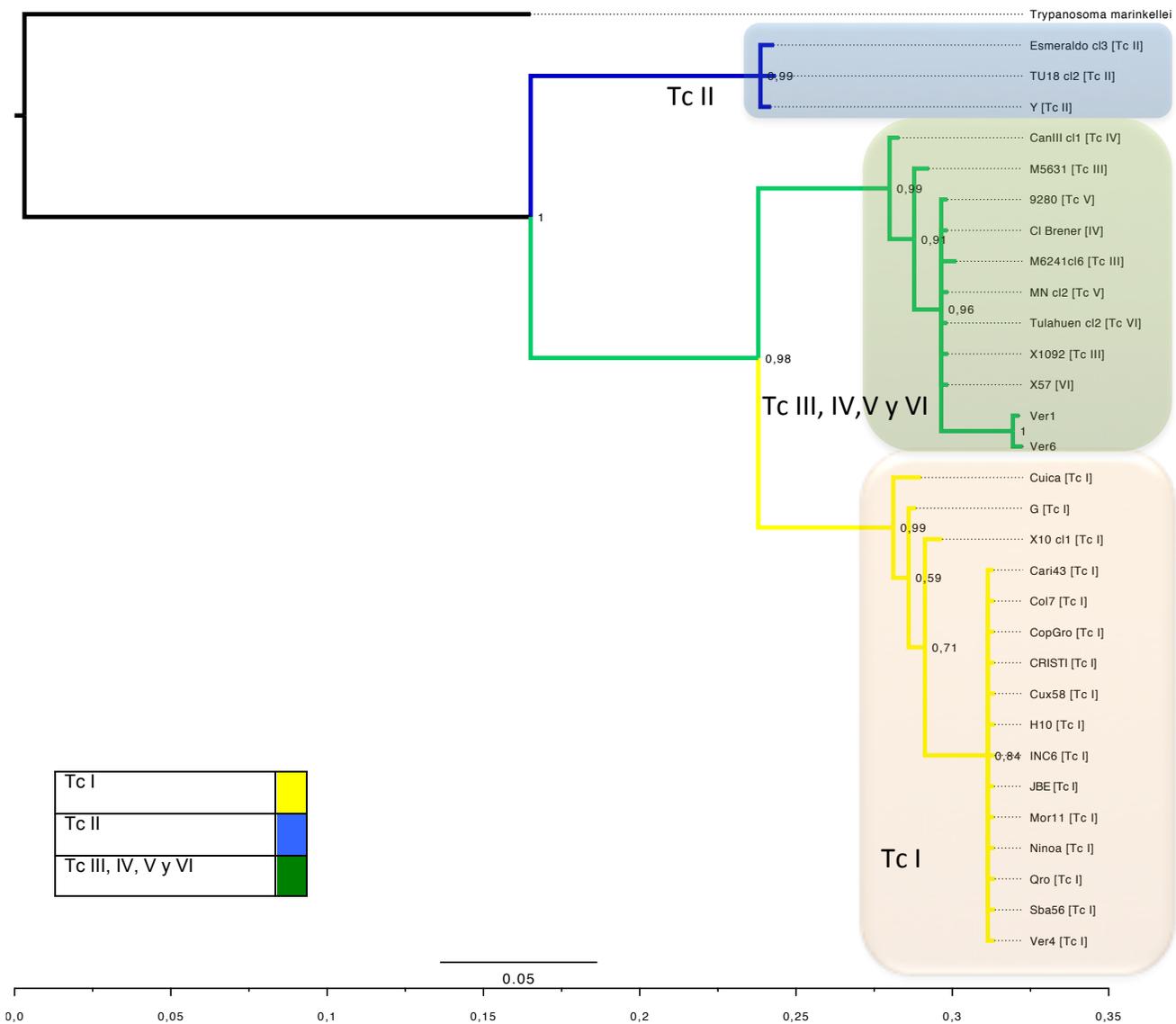


Figura 6.19. *Árbol filogenético del fragmento del gen mitocondrial de citocromo B de diferentes cepas y clonas pertenecientes a los diversos DTUs.* Se observa que las cepas mexicanas anteriormente clasificadas como Tc I se agrupan con cepas y clonas referencia Tc I, las cepas mexicanas Ver 1 y Ver 6, las cuales no pertenecen al DTU Tc I se agrupan con las cepas y clonas pertenecientes a los DTUs híbridos. Abajo del árbol filogenético se muestra una escala en la cual se puede determinar la distancia entre cada taxa.

6.7.2.2 Análisis de red Median Joining (MJ) de cepas No Tc I

Se construyó una red MJ, con la cual se intentó aumentar la sensibilidad del análisis, para determinar a que DTU pertenecen las cepas Ver 1 y Ver 6. A pesar de nuestro deseo de aumentar la sensibilidad del análisis, no fue posible determinar el DTU al cual pertenecen las Ver 1 y Ver 6, ya que siguen agrupándose con cepas y clonas pertenecientes a los grupos híbridos (**figura 6.19**).

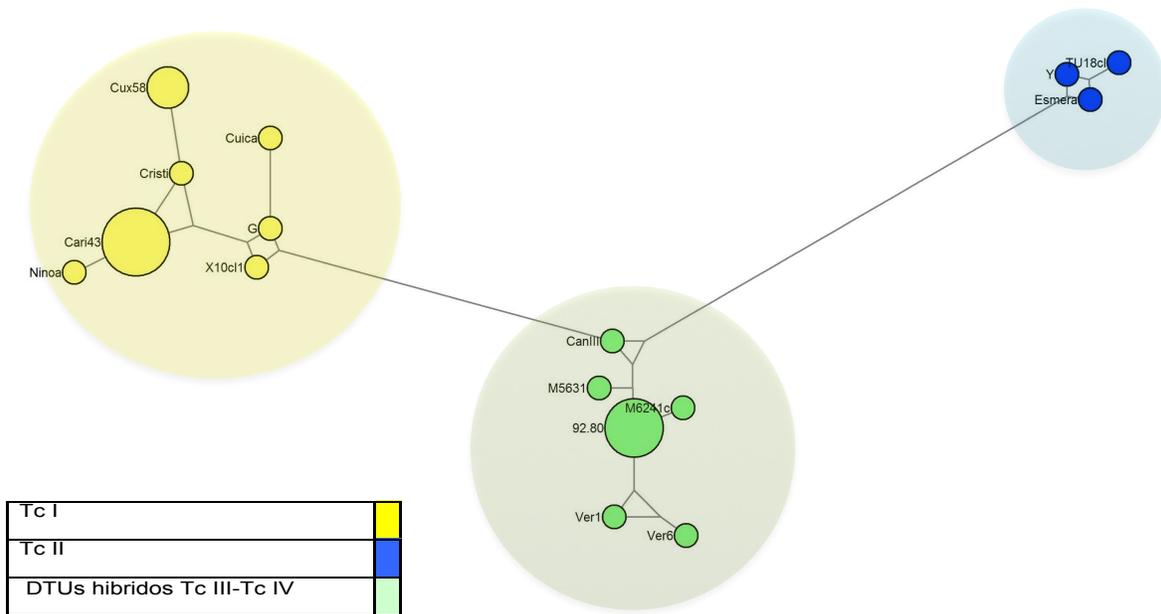


Figura 6.19 Red MJ analizando gen mitocondrial de citocromo B de los diferentes DTUs incluyendo todas las cepas mexicanas. Al observar la red es posible observar que las cepas y clonas se agrupan en tres diferentes grupos genéticos, las cepas y clonas Tc I, en donde se agrupan 13 de las 15 cepas mexicanas analizadas, clonas Tc II y el tercer grupo cepas y clonas pertenecientes a DTUs híbridos, en este grupo se encuentran las cepas Ver I y Ver 6. El tamaño de los nodos es proporcional al número de individuos que presentan la misma secuencia. La distancia entre cada nodo es proporcional al número de sustituciones.

7.0 Discusión de resultados

Al realizar el primer análisis con los microsatélites descritos por (Macedo et al., 2001) se encontró que existía cierta tendencia a la agrupación entre cepas aisladas de humano y un agrupamiento entre cepas de Cuxpala y otra agrupación entre las cepas de Nayarit, a pesar de ello estos agrupamientos no contaban con el soporte estadístico necesario, ya que los valores de probabilidad posterior son en muchos de los casos menores a 0.75. Por esa razón se decidió seleccionar 12 de las cepas anteriormente analizadas, incluyendo esta vez las cepas Ninoa, Qro y Ver 6 las cuales no se habían analizado con estos marcadores moleculares. Ya seleccionadas las cepa se reanalizaron con los microsatélites: SCLE11-12, MCLG 11-12, MCLF 11-12, MCL51-52 y SCLE 1-2, pero en lugar de resolver los productos de amplificación en geles de poliacrilamida al 12% de 7.7x8.6 cm², se resolvieron en geles de poliacrilamida al 15% de 18x17 cm² con la idea de mejorar el análisis. Esta modificación aumento la resolución, a pesar de ello este método no es suficientemente sensible, una posible alternativa, es la realización de una electroforesis capilar de los productos de PCR de los microsatélites.

Debido a la pérdida de sensibilidad, se observó en la mayor parte de los microsatélites gran homogeneidad, a pesar de ello fue posible distinguir dos diferentes patrones de bandeo entre cepas TcI, los cuales se denominaron subgrupo de no agrupados con patrón de bandeo tipo A y subgrupo con patrón de bandeo tipo B de SCLE 1-2. Al ampliar el análisis a 55 cepas fue posible relacionar los dos diferentes subgrupos de SCLE 1-2 con el origen biológico de los aislados; ya que el 80% de las cepas pertenecientes al subgrupo de no agrupados con patrón de bandeo tipo A provenían de humano, mientras que el 85% de las cepas pertenecientes al subgrupo con patrón de bandeo tipo B provenían de vector. Este hecho nos sugiere que posiblemente las cepas pertenecientes al subgrupo con patrón de bandeo tipo B, se adapten de mejor forma a los vectores y a los hospederos selváticos, mientras que las cepas pertenecientes al subgrupo de los no agrupados con patrón de bandeo tipo A, se adaptan mejor a los humanos.

Este fenómeno de relación entre genotipo y hospedero ya se ha descrito anteriormente con el gen mitocondrial de citocromo B (*Ramírez et al. 2011*). A pesar de estos resultados aún es necesario analizar cepas y clonas procedentes de otros países para ver si esta tendencia se mantiene, o únicamente ocurre con las cepas mexicanas, además de que es necesario analizar con un mayor número de microsatélites que sean polimórficos en aislados Tc I, como los utilizados por Llewellyn y colaboradores en 2009. Al realizar el análisis Bayesiano de las cepas mexicanas usando como marcador molecular el gen SL mini-exón, fue posible observar que los valores probabilidad posterior son bajos, lo cual no indica que el método del análisis sea malo, únicamente nos habla de cierta homogeneidad del gen mini-exón de las cepas y clonas TcI cuando se usa este como marcador. Este fenómeno ya se había observado con anterioridad (*Cura et al. 2010*), por tanto se decidió realizar un análisis de redes, el cual presenta mayor sensibilidad, pues tiene como conveniente que puede diferenciar un grupo genético entre otro por un solo nucleótido.

Lo primero que se pudo observar en el análisis de redes, fue que la mayor parte de las clonas y cepas de origen mexicano se agruparon con cepas y clonas pertenecientes al grupo genético Tc Ia lo cual coincide con reportes previos los cuales incluyen cepas de mexicanas (*Cura et al., 2010; Tomasini et al., 2011*). Al analizar las secuencias de SL mini-exón de cepas y clonas de *T. cruzi* Tc I de todo Latinoamérica y E.U. construyendo una red MJ, fue posible observar que algunos aislados anteriormente descritos como pertenecientes al grupo genético Tc Ib se agrupaban en dos grupos genéticos completamente diferentes; por un lado aquellas que tenían relación con los grupos Tc Ia y Tc Ic al cual denominamos grupo Tc Ib, y por otro lado aquellas que se encontraban relacionadas con las cepas mexicanas JBE y CopGro, las cuales formaron el nuevo grupo genético denominado Tc If. Cabe aclarar que antes de llegar a esta conclusión se revisó el alineamiento por dos personas

de forma independiente, con lo cual se deseaba eliminar un posible error en el alineamiento. En ese momento se creyó que una posible causa de la diferencia en los grupos genéticos, era que en este estudio se utilizaba en el análisis toda la secuencia de SL mini-exón, y en los estudios previos únicamente se analizaba el fragmento de SL-IR mini-exón (*Cura et al. 2010*), es decir únicamente la región intergenica de 49 nucleótidos donde se encuentran el grupo de SNPs que describen los diferentes grupos genéticos (*Falla et al., 2007, Herrera et al., 2009, Cura et al., 2010*).

Debido a la separación del grupo genético Tc Ib se decidió analizar únicamente la región homóloga de 49 pb que define los diferentes grupos genéticos, en este caso, la región paso de 40 pb a 52 pb, esto se debe a que al alinear las secuencias de las cepas mexicanas y las secuencias de los aislados de la región del Chaco (*Tomasini et al., 2011*), presentaban diferentes inserciones y deleciones (indels), lo cual ocasionó que al alinear todas las secuencias se incrementara el número de sitios a considerar.

En el análisis de SL-IR mini-exón mediante una red MJ, fue posible observar que las cepas y clonas, que en estudios anteriores fueron clasificadas como pertenecientes al grupo genético Tc Ib, siguen agrupándose en dos grupos diferentes, al igual que en el análisis utilizando toda la región de SL mini-exón. Este hecho lo podemos atribuir a que al aumentar el número de sujetos analizados, puede cambiar la topología de la red, ya que posiblemente en los estudios anteriores no se contaba con sujetos los cuales tuvieran una relación tan cercana con las cepas y clonas correspondientes al grupo genético Tc If y al introducir las cepas mexicanas, estas formaron un grupo genético diferente. También fue posible distinguir que las cepas Mor11, Col7 y CRISTI se encuentran relacionadas con el grupo genético Tc Id.

El tercer marcador que se utilizó fue el gen mitocondrial de citocromo B, en un principio se deseaba analizar un fragmento de 950pb, con lo cual se creía que se obtendría mayor información, ya que a mayor porción del gen analizado existía la posibilidad de obtener más información. A pesar de ello nos dimos cuenta que el fragmento de 950 pb de gen mitocondrial de citocromo B de las cepas mexicanas de los nucleótidos 512-952 no era informativo, es decir no presentaba ninguna variación entre cepa ya que en todas las secuencias era igual esta región, además de que en el Genbank no existen secuencias de citocromo B mitocondrial de *T. cruzi* TcI con este tamaño, por esta razón la región de 512-950 pb se eliminó del análisis.

Al realizar un análisis Bayesiano de las secuencias de citocromo B mitocondrial, fue posible distinguir 2 grupos genéticos predominantes, el grupo 1 el cual consta de los aislados colombianos de origen humano clasificados como pertenecientes al grupo genético A (*Ramirez et al. 2011*); mientras que el

grupo 2 esta conformado por 4 subgrupos, el subgrupo de los no agrupados, en el cual se encuentran las cepas mexicanas y clonas colombianas que anteriormente se habían clasificado como pertenecientes a los grupos genéticos B,C y D de citocromo B mitocondrial (Ramírez et al., 2011), el subgrupo 2.1y 2.2 los cuales están conformados por cepas chilenas anteriormente descritas como pertenecientes a los genotipos Tc IA y Tc IB de citocromo b (Spotorno et al., 2008); y el subgrupo 2.3 donde se encuentran las cepas colombianas anteriormente descritas como pertenecientes al genotipo D (Ramírez et al., 2011). El colapsamiento de los grupos genéticos B, C y D descritos por Ramírez y colaboradores en el 2011 en un solo grupo genético al cual denominamos grupo 2 subgrupo de no agrupados, se pudo deber a que las distancias genéticas son pequeñas entre los aislados de estos grupos y al aumentar el número de sujetos analizados se disminuyeron las distancias genéticas relativas. Algo que nos llamó la atención es que los aislados de origen humano colombianos se agrupan en el grupo genéticos 1, en el caso de las cepas mexicanas de origen humano todas se agruparon en grupo genético 2 en el subgrupo de no agrupados, lo cual nos puede indicar una relación entre grupo genético y origen geográfico, a pesar de ello es necesario analizar un número mayor de cepas mexicanas con diferentes orígenes biológicos e incluir aislados que provengan de diferentes países.

Al igual que en el análisis de SL mini-exón, al analizar el gen mitocondrial de citocromo B se construyó una red filogenética MJ, con lo cual se deseaba aumentar la sensibilidad del análisis. En esta ocasión fue posible distinguir los grupos genéticos anteriormente descritos (Spotorno et al., 2008; Ramírez et al., 2011), y también se encontró que las cepas mexicanas se relacionaban entre sí formando un solo grupo. Este agrupamiento entre las cepas mexicanas, nos puede indicar que estas tienen ciertas características específicas, las cuales son resultado de la adaptación de las condiciones geográficas, a los vectores biológicos e incluso a la adaptación de los parásitos a los hospederos de la región. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por O'Connor en el 2006 en el cual se observó que las cepas mexicanas de *T. cruzi* Tc I son diferentes genéticamente a los aislados de otras regiones de Latinoamérica (O'Connor et al., 2006).

Debido a que la información genética obtenida con un solo gen es bastante limitada, se realizó un análisis Bayesiano en el cual se analizaron de forma simultánea los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial, debido a que cada gen tiene una tasa evolutiva diferente se tuvo que compartamentalizar el análisis, con lo cual se analizó con diferente modelo evolutivo cada gen. El resultado del análisis conjunto de los genes SL mini-exón y citocromo B, fue un árbol filogenético en el cual existen dos grupos genéticos principales, el primer grupo genético está determinado por parásitos colombianos pertenecientes al grupo genético 1 de citocromo B mitocondrial y en el

segundo grupo se reunieron el resto de las clonas y cepas, las cuales pertenecían a los grupos genéticos 2-5 de citocromo B mitocondrial. Este fenómeno se puede deber a que al analizar de forma simultánea los genes SL mini-exón y citocromo B mitocondrial, el gen que domina la topología es el gen mitocondrial de citocromo B. Al igual que en el análisis del gen mitocondrial de citocromo B, las cepas mexicanas se agrupan en una sola rama, lo cual hace más fuerte la teoría de que las cepas mexicanas son distinguibles a cepas de otros países.

Al integrar todos los análisis realizados a las cepas mexicanas TcI, es posible observar que existen diferentes resultados dependiendo del marcador molecular utilizado, ya que al utilizar el microsatélite SCLE 1-2 y el gen SL mini-exón se observa cierta variación. En el caso del análisis del gen mitocondrial de citocromo B y el análisis conjunto de los genes SL mini-exón y gen mitocondrial de citocromo B observamos gran homogeneidad, esto último lo podríamos atribuir a que en la topología del árbol suma predomina la topología dada por el gen mitocondrial de citocromo B (**Tabla 6.9**). Estos resultados nos indican que aún es necesario la búsqueda de nuevos marcadores moleculares asociados con la patogenicidad y virulencia de los parásitos, como lo son proteínas de superficie (*Cerqueria et al., 2008*) o la secuenciación de genes ribosomales, ya que en estos últimos se ha encontrado variación entre las cepas mexicanas (*Zavala-Castro et al. 1993*).

A pesar de que se ha demostrado que el DTU predominante en México es TcI (*Bosseno et al., 2002*), en este estudio se analizaron 2 cepas mexicanas que no pertenecen a este DTU, Ver I y Ver 6. Al realizar un análisis Bayesiano del gen SL mini-exón, se distinguieron cuatro grupos genéticos, en el primero de ellos se agrupan las cepas TcI; el segundo grupo genético agrupan cepas y clonas pertenecientes a los DTUs TcII, V y TcVI, lo cual resulta lógico ya que los DTUs TcV y TcVI son híbridos del DTU TcII, en este grupo genético se agrupan las cepas mexicanas Ver 1 y Ver 6, lo cual nos indica que las cepas mexicanas no TcI posiblemente pertenezcan a alguno de estos DTUs; el tercer grupo genético está conformado por aislados pertenecientes al DTU TcIII; y finalmente el cuarto grupo genético está conformado por aislados pertenecientes al DTU TcIV.

En los dos análisis realizados al gen mitocondrial de citocromo B fue posible distinguir tres grupos genéticos, el primero de ellos correspondía a los aislados pertenecientes al DTU TcI, el segundo grupo genético corresponde a los aislados pertenecientes a los DTUs híbridos TcIII-VI, y finalmente el tercer grupo genético corresponde a aislados pertenecientes al DTU TcII. La topología obtenida a partir del análisis Bayesiano y el análisis de red MJ del gen mitocondrial de citocromo B, es similar a la topología reportada anteriormente (*Pena et al., 2009*). En los dos análisis se observó que las cepas Ver I y Ver 6 se agruparon con los aislados pertenecientes a los DTUs híbridos (DTU TcIII-VI).

Al conjuntar los resultados obtenidos de los diferentes análisis realizados a los genes SL mini-exón y el gen mitocondrial de citocromo B, pudimos determinar que las cepas mexicanas Ver 1 y Ver 6 pertenecen a alguno de los DTUs híbridos TcV o TcVI, para determinar con mayor exactitud a que grupo genético pertenece es necesario realizar estudios de amplificación de los genes ribosomales 24S α y 18S α rADN (Zingales et al., 2012).

Haber encontrado cepas mexicanas las cuales no pertenecen al DTU TcI es muy importante. Un estudio reciente publicado en este año, en el cual se analizaron Triatomas de la especie *dimidiata* infectados por *T. cruzi*, provenientes de domicilios o áreas peridomestica del estado de Veracruz, demostró que existía una gran variabilidad genética de *T. cruzi*, encontrándose que de un 13-27% de los triatominos, se encontraban infectados con *T. cruzi* no perteneciente a Tc I, se han encontrado TcII, TcIII, TcV y TcVI (Ramos-Ligonio et al., 2012). Adicionalmente, este resultado concuerda con algunos reportes en los cuales se ha encontrado la presencia de aislados en Estados Unidos pertenecientes al DTU TcIV, el cual es un DTU híbrido al igual que los DTUs TcV y TcVI (Zingales et al. 2012). Algo relevante de las cepas Ver 1 y Ver 6, es que se aislaron a partir de reservorios, lo cual nos indica que es necesario ampliar el grupo de estudio e integrar un mayor número de aislados de origen selvático y de reservorios, ya que posiblemente al analizar estos aislados podamos observar mayor diversidad genética en los aislados de *T. cruzi* de México.

8.0 Conclusiones

Al analizar las 15 cepas mexicanas, de las cuales 13 pertenecen al DTU TcI, fue posible determinar que las cepas mexicanas son características de la región, ya que se observa que se diferencian de otras cepas y clonas provenientes de otros países. También fue posible encontrar que el microsatélite SCLE 1-2 nos permitió determinar una asociación entre origen biológico y genotipo, lo cual nos indica cierta adaptación de algunos genotipos a ciertos hospederos.

Al analizar SL mini-exón fue posible determinar que el grupo genético anteriormente denominado Tc Ib encontrado en cepas colombianas se dividió en dos grupos genéticos, los cuales denominamos Tc Ib y Tc If, fue también posible determinar que en México existe la presencia de los genotipos Tc Ia, Tc If y Tc Id.

En el caso del análisis del gen mitocondrial de citocromo B, se determinó que las cepas mexicanas son altamente homogéneas con este marcador, encontrándose que pertenecen al grupo 2 subgrupo de no agrupados del gen mitocondrial de citocromo B; y al realizar el análisis de red MJ fue posible observar que las cepas mexicanas se logran diferenciar de las cepas y clonas de otros países. Al

realizar el análisis conjunto del gen SL mini-exón y gen mitocondrial de citocromo B, se encontró el mismo resultado encontrado en el análisis de citocromo B.

Fue posible determinar que las cepas Ver 6 y Ver 1 pertenecen a los DTUs híbridos Tc V o Tc VI, lo cual abre la puerta al estudio de cepas No TcI mexicanas.

9.0 Perspectivas

A pesar de todos estos resultados es recomendable aumentar el número de aislados que se estudien, agregando aislados de origen selvático, al igual que la inclusión de clonas, ya que se ha comprobado que las cepas son poblaciones de parásitos genéticamente heterogéneos (Yeo *et al.*, 2007). En nuestro laboratorio hemos logrado clonar aproximadamente 30 cepas, las cuales se desean analizar con microsátelites que nos permitan la subdivisión del DTU TcI, esto se realizara utilizando el panel de 48 primers utilizados por Llewellyn y colaboradores en el 2009. También es necesario el análisis de nuevos marcadores moleculares relacionados con factores de virulencia y patogenicidad, como son algunas proteínas de superficie que interactúan con la célula del hospedero (Cerqueira *et al.*, 2008), o enzimas como la cruzipaina, la cual esta involucrada en la defensa del sistema inmune.

Otro punto importante de este estudio es el análisis de genomas completos, ya que es difícil realizar inferencia filogenética únicamente utilizando tres marcadores moleculares. Al realizar la secuenciación masiva de los diferentes aislados pertenecientes a los diferentes grupos genéticos de SL mini-exón y citocromo B, se podrá realizar una comparación entre las regiones del genoma conservadas y variables, con lo cual se podría realizar una mejor selección de los genes a analizar.

Una de las razones por las cuales en el laboratorio se realizan el estudio genético de los diferentes aislados de *T. cruzi* es relacionar la diversidad genética con los mecanismos de invasión y diferentes comportamientos en la patogénesis de la enfermedad usando parásitos pertenecientes a los diferentes grupos genéticos. Al tener clonas de *T. cruzi*, las cuales ya se han caracterizado genéticamente, se podrían llevar diferentes ensayos de invasión “*in vitro*” e “*in vivo*” con lo cual se podría determinar las implicaciones biológicas de la diversidad genética.

10.0 Bibliografía:

Bandlet H., Forster P., Röhl A.; 1999; *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*; Mol. Biol. Evol.;16: 37-48.

Björn A.; 2011; *The Trypanosomacruzi genome; conserved core genes and extremely variable surface molecule families*; R. Microbio.; 162: 619–625.

Bosseno M., Barnabe C., Magallón-Gastélum E., Lozano-Kasten F., Ramsey J., Espinoza B., Brenière S.; 2002; *Predominance of Trypanosoma cruzi lineage I in México*; J. Clin. Microbio.; 40: 627-63.

Bosseno M., Espinoza B., Sánchez B., Brenière S.; 2000; *Mexican Trypanosoma cruzi stocks: analysis of minicircle kDNA homologies by cross-hybridization*; J. Clin. Microbio., 95: 473-476.

Buscaglia C., Noia J.; 2003; *Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease*; Microbio. Infec.; 5: 419–427.

Camargos E., Franco D., Garcia C., Dutra A., Teixeira A., Chiari E., Machad C.; 2000; *Infection with different Trypanosoma cruzi populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs*; Am. J. Trop. Med. Hyg.; 62: 604-612.

Cerqueira G., Bartholomeu D., D. DaRocha W., Hou L., Freitas-Silva D., Machado C., El-Sayed N., Texeira S.; 2008; *Sequence diversity and evolution of multigene families in Trypanosoma cruzi*; Mol. and Bio. Para.; 157: 65–72.

Cura C., Mejía-Jaramillo A., Duffy T., Burgos J., Rodriguero M., Kjos S., Gurgel-Gonçalves R., Blanchet D., De- Pablos L., Tomasini N., Da-Silva A., Russomando G., Cuba C., Aznar C., Abate T., Levin M., Osuna A., Gürtler R., Diosque P., Solari A., Triana-Chávez O., Schijman A.; 2010; *Trypanosoma cruzi I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes*; I. J. Para.; 14:1599-1607.

Da-Silva A., Manoel-Caetano F., Silva A; 2007; *Implications of genetic variability of Trypanosoma cruzi for the pathogenesis of Chagas disease*; Cad. Sau. Pub.; 23: 2263-2274.

Deane M., Jansen A., Lenzi H.; 1984; *Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum Didelphis marsupialis*; Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79: 513-515.

De-Luna E., Guerrero J., Chew-Taracena T.; 2005; *Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética*; Hidrobiológica México; 15: 351-370.

Devera R., Fernandes O., Rodrigues- Coura J.; 2003; *Should Trypanosoma cruzi be Called cruzi Complex. A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection*; Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 98:1-12.

Espinoza B., Vera-Cruz J., Gonzalez H., Ortega E., Hernandez R.;1998; *Genotype and virulence correlation within mexican stocks of Trypanosoma cruzi insolated from patients*; Act. Tropica; 70: 63-72.

Espinoza B., Solorzano-Domínguez N., Vizcaino-Castillo A., Martínez I., Elias-López A., Rodríguez-Martínez J.; 2011; *Gastrointestinal infection with Mexican TcI Trypanosoma cruzi strains: Different degrees of colonization and diverse immune Responses*; *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7: 1357–1370.

Espinoza- Gutiérrez B., Mannie- Cela R.; 2007; *Advances in the immunobiology of parasites diseases*; Editor Terrazas L.; Ed. Research Sign. Post.; India.

Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G., Guhl F.; 2009; *Haplotype identification within Trypanosoma cruzi I in Colombian insulates from several reservoirs, vectors and humans*; *Acta Trop.*; 110: 15–21.

Fernandes O., Souto R., Castro J., Pereira J., Fernandes N., Junqueira A., Naiff R., Barrett T., Degrave W., Zingales B., Campbell D., Coura J.; 1998; *Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences*; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 58: 807-811.

Gaunt M., Yeo M., Frame I., Stothard J., Carrasco H., Taylor M., Mena S., Veazey P., Miles G., Acosta N., De-Arias A., Miles M.; 2003; *Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes*; *Nature*; 421: 936-9.

Galvan S., Rubio J., Sanchez R., Ortega J., Castañeda M.; 1983; *Phenetic variation in Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi isolates*; *Comp. Biochem. Physiol.*; 74: 573–578.

Herrera C., Bargues M., Fajardo A., Montilla M., Triana O., Vallejo G., Guhl F.; 2007; *Identifying four Trypanosoma cruzi I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia*; *Infect. Genet. Evol.*; 7: 535–539.

Hernandez R., Rios P., Valdes A., Piñeiro D.; 1990; *Primary structure of Trypanosoma cruzi small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids*; *Mol. and Bio. Para.*; 41: 207-212.

Llewellyn M., Miles M., Carrasco H., Lewis M., Yeo M., Vargas J., Torrico F., Diosque P., Valente V., Valente S., Gaunt M; 2009; *Genome-Scale multilocus microsatellite typing of Trypanosoma cruzi discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection*; *Plos Phath.*; 5.

Lewis M., Ma J., Yeo M, Carrasco H., Llewellyn M., and Miles M.; 2009; *Genotyping of Trypanosoma cruzi: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages*; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 81: 1041–1049.

Lopez-Olmos V., Pérez-Nesser V., Piñero D., Ortega E., Espinoza B.; 1998; *Biological characterization and genetic diversity of mexicans isolates of Trypanosoma cruzi*; *Acta Trop.*; 69: 239-254.

Macedo A., Pimenta J., Aguiar R., Melo A., Chiari E., Zingales B., Pena S., Oliveira R.; 2001; *Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of Trypanosoma cruzi*; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 96: 407-413.

- Macedo A., Machado C., Oliveira R., Pena S.; 2004; *Trypanosoma cruzi: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease*; Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 99: 1-12.
- Macedo A., Pena S.; 1998; *Genetic variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the pathogenesis of Chagas disease*; *Parasitology Today*; 14: 119-124.
- Macedo A., Pimenta J., Aguiar R., Melo A., Chiari E., Zingales B., Pena S., Oliveira R.; 2001; *Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of Trypanosoma cruzi*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 96: 407-413.
- Manoel-Caetano F., Da-Silva A.; 2007; *Implications of genetic variability of Trypanosoma cruzi for the pathogenesis of Chagas disease*; *Cad. Saude. Publica*; 23: 2263-2274.
- Marcet P., Duffy T., Cardinal M., Burgos J., Lauricella M., Levin M., Kitron K., Gürtler R., Schijman A.; 2006; *PCR-based screening and lineage identification of Trypanosoma cruzi directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina*; *Nat. Inst. of Health*; 132: 57–65.
- Martinez; 2006; *Tesis: Caracterización molecular de cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi y sensibilidad de las mismas a Nifurtimox y Benznidazol*. Laboratorio de Investigación en Trypanosomiasis, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Martinez F., Espinoza B.; Capitulo: Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas; En enfermedades emergentes; Editorial: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En prensa.
- Martínez F., Villalobos G., Cevallos A., Torre L., Laclette J., 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. Phyl. Evol.*; 41: 279-287.
- Mejía A., Triana O.; 2005; *Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de Trypanosoma cruzi en sangre y órganos de ratones*; *Biomédica*; 25:76-86
- Morel C., 1999; *Chagas disease, from discovery to control and beyond: History, Myths and Lessons to take home*; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94: 3-16.
- O` Connor O., Boseno M., Barnabe C., Douzery E., Brenière S.; 2007; *Genetic clustering of Trypanosoma cruzi I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing*; *Infect. Genet. Evol.*; 7: 587–593.
- Oliveira R., Broude N., Macedo A., Cantor C., Smith C., Pena S.; 1998; *Probing the genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites*; *Natl. Acad. of Scie.*; 95: 3776-3780.
- Pumaral A., Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J., Piedrola- Angulo G.; 1994; *Microbiología y Parasitología Médica*; 2da edición; Editorial Salvat; Madrid España.

- Pena S., Machado C., Macedo A.; 2009; *Trypanosoma cruzi: ancestral genomes and population structure*; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 104(Suppl. I): 108-114.
- Ramirez J., Duque M., Guhl F.; 2011; *Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian Trypanosoma cruzi I populations*. *Acta Trop.*; 119(1):61-65.
- Rassi A jr., Rassi A., Marin-Neto; 2010; *Chagas disease*; *Lancet*; 75: 1388–1402.
- Reithinger R., Tarleton R., Urbina J., Kitron U., Gürtler R.; 2009; *Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap*; *Bio. Med. J.*; 338: 1044-1046.
- Riley L.; 2004; *Molecular Epidemiology of infectious diseases: principles and practice*; Primera edición; Am. S. Microb.; Washington DC, US.
- Ruíz-Sánchez R., De-León M., Matta V., Reyes P., López R., Jay D., Monteón V.; 2005; *Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I*; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 100: 281-283.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.; 2003; *MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*; *Bioinfo. Appli. Note*; 19: 1572-1574.
- Salazar A., Schijman A., Chavez T.; 2006; *High variability of Colombian Trypanosoma cruzi linaje I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signature*; *Acta Trop.*; 100: 110–118.
- Salazar-Schettino; 2003; *Enfermedad de Chagas situación en México*; *Gac. Med. Mex.*; 139: S68-S80.
- Sánchez B., Monteón V., Reyes P., Espinoza B.; 2001; *Standardization of ELISA and Western blot for detection of Trypanosoma cruzi. Antibodies using extracts of Mexican strains as antigens; concordance between laboratories*; *Am. Med. Res.*; 32: 382-388.
- Schmunis G., Yadon Z.; 2009; *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*; *Acta Trop.*; 115: 14-21.
- Souto P., Fernandez O., Macedo A., Campbell D., Zingales B.; 1996; *DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi*; *Mol. Bioq. Para.*; 83: 141-152.
- Spotorno O., Córdova L., Solari I.; 2008; *Differentiation of Trypanosoma cruzi I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences*; *Infect. Genet. Evol.*; 8: 898-900.
- Stevens J., Noyes H., Schofield C., Gibson W.; 2001; *The molecular evolution of Trypanosomatides*; *Ad. Para.*; 48 : 1-53.
- Stevens J., Noyes H., Dover G., Gibson W.; 1999; *The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi*; *Parasitology* ; 118: 107-116.
- Sturm N., Campbell D.; 2009; *Alternative lifestyles: the population structure of Trypanosoma cruzi*; *Acta Trop.*; 115: 35-43.

Tomasini N., Lauthier J., Monje-Rumi M., Ragone P., Alberti-D'Amato A., Perez-Brandan C., Cura C., Schijman A., Barnabe C., Tibayrenc M., Basobrio M., Falla A., Herrera C.; 2011; *Interested and limitations of Spliced Leader Intergenic Region sequences for analyzing Trypanosoma cruzi I phylogenetic diversity in the Argentina Chaco*; Infect. Genet. Evol.; 11: 300-307.

Tomazi L., Kawashita S., Pereira P., Zingales B., Briones M.; 2009; *Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that Trypanosoma cruzi hybrid strains are polyphyletic*; Genet. Mol. Res.; 28: 458-76.

Zavala-Castro J., Velasco-Castrejón O., Hernandez R., 1992; *Molecular characterization of Mexican stocks of Trypanosoma cruzi using total DNA*; Am. J. Trop. Med. Hyg.; 47: 201–209.

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

Zingales B., Miles M., Campbell D., Tibayrenc M., Macedo A., Teixeira M., Schijman A., Llewellyn M., Lages-Silva E., Machado C., Andrade S., Sturm N.; 2012; *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications*. Infect. Genet. Evol. En 12(2):240-53

11.0 Paginas web consultadas:

Chagamex:

Chagamex:<http://www.unibio.unam.mx/chagamex>

Drug for Neglected Diseases initiative:

<http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>

Figtree:

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Fundación Oswaldo Cruz:

http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=2

Microbios en línea:

http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_19/Capitulo19.pdf

Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación(Argentina); Manual para la atención del paciente infectado con Trypanosoma cruzi:

http://www.sadi.org.ar/files/ManualChagas_2005.pdf

MEGA:

<http://www.megasoftware.net/>

Model Test:

<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>

Mr. Bayes:

<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>

Nanodrop1000 V 3.7; Manual del usuario:

<http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>

Network 4.6.1.0. y DNA alignment 1.3.0.1:

<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>

Organización Mundial de la Salud:

http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf

<http://www.mex.opsoms.org/contenido/chagas/situaci%C3%B3n.htm>

<http://www.who.int/bulletin/volumes/87/7/09-030709/es/index.htm>

Organización Panamericana de la Salud:

<http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/chagas%20enero-junio-09.pdf>

12.0 Anexos

12.1 Anexo 1 (Análisis Bayesiano)

En un análisis Bayesiano se parte del teorema de Bayes, en el cual se da una conclusión a partir de diferentes hipótesis, concluyendo cual es la hipótesis más probable a partir de los resultados. La diferencia con otro tipo de análisis estadísticos con enfoque clásico es que en este último se parte de un supuesto, mientras que en el análisis Bayesiano se hace un supuesto a partir de los datos obtenidos (De-Luna et al., 2005).

Uno de los usos del análisis Bayesiano es para inferir filogenias, en este caso se calcula en cada árbol la probabilidad posterior, la cual es definida como la probabilidad condicional de una hipótesis (H) dados los datos observados (De-Luna et al., 2005).

En el caso del análisis Bayesiano aplicado a filogenia, se usa generalmente el programa Mr. Bayes, el obtiene el árbol filogenético que maximice la probabilidad posterior, a partir de un modelo evolutivo. Ya elegido el modelo evolutivo, se crean al azar diferentes arboles evolutivos por varias generaciones, los cuales son muestreados por las cadenas calientes y fría de Monte Carlo Markov (MCMC). Las cuales tienen como función encontrar el árbol filogenético que maximice la probabilidad posterior. Las cadena fría es un tipo de función que muestrea de forma estricta todos los árboles filogenéticos, mientras que las cadenas calientes son funciones menos estrictas, con lo cual el proceso es más rápido. Para maximizar la eficiencia en la búsqueda del árbol filogenético con mayor probabilidad posterior, las cadenas calientes intercambian de posición con la cadena fría hasta encontrar el mejor árbol filogenético (De- Luna et al., 2005).

12.2 Anexo 2 (Análisis de red Median Joining)

Las redes filogenéticas Median Joining, son un tipo de red de haplotipos, este tipo de red sirven para detectar pequeñas diferencias en poblaciones, las cuales son difíciles de observar con análisis convencionales. En este tipo de redes los sujetos se agrupan de acuerdo a su haplotipo, es decir tomando en cuenta un conjunto de SNPs (*Bandlet et al., 1999*).

El fundamento de las redes median joining es que se crean árboles filogenéticos de expansión mínima (MTS) los cuales se comienzan a combinar entre sí uniendo cada árbol mediante nodos intermedios (median vectors), la topología de la red se da gracias al criterio de máxima parsimonia, el cual indica que la red más probable es aquella que tenga menor número de cambios evolutivos (*Bandlet et al., 1999*).

En las redes Median joining, los diferentes haplotipos son representados como nodos. El tamaño de los nodos representa el número de individuos con el mismo haplotipo (*Bandlet et al., 1999*).

12.3 Anexo 3 (Peso molecular de fragmentos de amplificación de microsatélite)

Alelo	Peso molecular (pb)
SCLE 11 12(1)	89
SCLE 11 12(2)	156
SCLE 11 12(3)	132
SCLE 11 12(4)	183
SCLE 11 12(5)	297
SCLE 11 12(6)	360
SCLE 11 12(7)	472
SCLE 11 12(8)	448
SCLE 11 12(9)	480
SCLE 11 12(10)	537
SCLE 11-12 (11)	638
MCLG 11 12 (1)	680
MCLG 11 12 (2)	631
MCLG 11 12 (3)	609
MCLG 11 12 (4)	543
MCLG 11 12 (5)	523
MCLG 11 12 (6)	507
MCLG 11 12 (7)	448
MCLG 11 12 (8)	421
MCLG 11 12 (9)	397
MCLG 11 12 (10)	366
MCLG 11 12 (11)	293
MCLG 11 12 (12)	266
MCLG 11 12 (13)	228
MCLG 11 12 (14)	192
MCLG 11 12 (15)	158
MCLG 11 12 (16)	96
MCLE 11 12 (1)	486
MCLE 11 12 (2)	476
MCLE 11 12 (3)	467
MCLE 11 12 (4)	458
MCLE 11 12 (5)	432
MCLE11 12 (6)	382
MCLE 11 12 (7)	390
MCLE 11 12 (8)	300
MCLE 11 12 (9)	246
MCLE 11 12 (10)	215
SCLE 1-2 (1)	854
SCLE 1-2 (2)	766
SCLE 1-2 (3)	714
SCLE 1-2 (4)	651
SCLE 1-2 (5)	577
SCLE 1-2 (6)	525
SCLE 1-2 (7)	392
SCLE 1-2 (8)	457
SCLE 1-2 (9)	411
SCLE 1-2 (10)	383
SCLE 1-2 (11)	356
SCLE 1-2 (12)	329
SCLE 1-2 (13)	305
SCLE 1-2 (14)	236
SCLE 1-2 (15)	182
MCLF (1)	1090
MCLF (2)	733
MCLF (3)	673
MCLF (4)	590
MCLF (5)	539
MCLF (6)	469
MCLF (7)	426
MCLF (8)	365
MCLF (9)	327
MCLF (10)	256
MCLF (11)	239
MCLF (12)	191
MCLF (13)	161
MCLF (14)	132
MCL 51-52 (1)	1049
MCL 51-52 (2)	872
MCL 51-52 (3)	797
MCL 51-52 (4)	705
MCL 51-52 (5)	624
MCL 51-52 (6)	586
MCL 51-52 (7)	535
MCL 51-52 (8)	502
MCL 51-52 (9)	442
MCL 51-52 (10)	373
MCL 51-52 (11)	348
MCL 51-52 (12)	300
MCL 51-52 (13)	266
MCL 51-52 (14)	224
MCL 51-52 (15)	193
MCL 51-52 (16)	175