



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CLONAS DE
CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANDREA TREJO MELLADO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA
GUTIÉRREZ
CIUDAD DE MÉXICO, 2019



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.

1. Datos del Alumno

Trejo
Mellado
Andrea
5585512353
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311221570

2. Datos del tutor

Doctora
Bertha Josefina
Espinoza
Gutiérrez

3. Datos del sinodal 1

Doctor
Daniel Sokani
Sánchez
Montes

4. Datos del sinodal 2

Maestra
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán

5. Datos del sinodal 3

Doctora
Deyanira
Pérez
Morales

6. Datos del sinodal 4

Maestro
Ignacio
Martínez
Martínez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización biológica de clonas de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*
85 páginas
2019

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por brindarme su confianza y apoyo para la realización de este proyecto y por proponerme como ayudante de investigador.

A mis sinodales: el Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes, la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, la Dra. Deyanira Pérez Morales y el M. en C. Ignacio Martínez Martínez, por sus aportaciones, críticas, comentarios y correcciones hacia el proyecto.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su apoyo técnico en el cultivo de epimastigotes de las cepas y clonas empleadas en este trabajo. Por su asesoría, sus enseñanzas, su apoyo y paciencia.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su asesoría en el manejo del microscopio invertido.

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

A la Dra. Rosa Elena Cárdenas por sus comentarios, enseñanzas, su apoyo y por la revisión del escrito.

Al Dr. Rubén Arroyo Olarte, por asesorarme en la realización de los qRT-PCR.

A Jane Eyre Nieto Landaverde por el aislamiento de las clonas utilizadas para la elaboración de este proyecto.

A los biólogos Cristina Bastida Jaime, Edgar Quezada Ruiz y Génesis Dehesa Rodríguez por enseñarme la mayoría de las técnicas utilizadas en este trabajo, por el apoyo en el análisis de datos y realizarlas conmigo.

Al biólogo Luis Enrique Juárez Sotelo, por su ayuda con los análisis estadísticos realizados y sus correcciones de escritura.

Al biólogo Julián Pineda Ríos por su ayuda con las fotografías de los parásitos.

Al Sr. Osvaldo Martínez, por su apoyo como laboratorista en la limpieza y esterilizado del material.

Al Fondo Familia Espinoza-Gutiérrez, por la beca que me fue proporcionada como apoyo para concluir la licenciatura.

Al proyecto PAPIIT.UNAM IN208417 por el apoyo brindado al laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

DEDICATORIA

A mis padres, por darme tanto y recibir tan poco. Por ser mi motor para seguir adelante cada día y ser la razón por la que sigo viva. Por darme todo el amor del mundo. Por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Por apoyar mis decisiones aunque éstas no fueran las mejores, dejar que aprendiera de los errores y estar ahí para no dejarme caer. Por aguantar mis cambios emocionales, mis malos tratos, mis malestares, mis enfermedades y esas noches de hospital. Por sacrificar todo por nosotros a pesar de su cansancio. Esto es por ustedes y es sólo un paso de muchos. Los amo con toda mi existencia.

A mi hermano Alonso, por ser mi ejemplo a seguir de toda la vida, por demostrarme tu cariño a manera de burlas, juegos y chistes. Gracias por ser el mejor cómplice que puedo tener y por estar siempre que lo necesito. Gracias por estar siempre y no dejarnos caer.

A mi tío Beni, por ser un segundo padre para mí. No creo en el cielo, pero sé que de alguna forma tú siempre estas cuidando de mí. Me haces tanta falta, te extraño cada día más.

A Alonso Villafuerte, porque marcaste mi vida de tantas formas en tan poco tiempo. Por ser el mejor amigo y padre del mundo. Te extraño siempre. Gracias por demostrarme tanto.

A mis tíos Daniel, Miguel, Ángeles; a mis primos Ricardo, Miguel, Manuel y Mariana. Gracias por su apoyo, por su presión para titularme y por escucharme tan atentamente cada vez que había una plática ñoña. Son la mejor familia que pude haber pedido.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Cris, Fabby, Gen, Pau, Lucio, Esteban, Edgar, Rouss, Karlita y Kari, por su apoyo, críticas y consejos durante la realización del proyecto. Por brindarme su amistad y volverse mí segunda familia. Por su paciencia en los días de estrés y tristeza. Por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio y por hacer mi estancia mucho más grata.

A mis amigos, que son parte fundamental de mi vida. Con mucho amor a *Cocodrilukis*: Danny, Fer y David; por ser mi familia, por enseñarme que siempre hay que luchar por lo que se desea, por estar siempre que los necesitaba en buenos y malos momentos, por hacer de estos años los más hermosos de mi vida, por las experiencias vividas y por su amistad incondicional. A mis amigos de la carrera: Aranza, Emi, Mariana de la Cruz, Alex, Jorge, Caro, Ferni, Rodri, Lu, Diana, Kelly y Diego por darme de los mejores momentos en clases y fuera de ellas, por sus consejos y enseñanzas; por las experiencias vividas, fiestas y aventuras, por su apoyo, pero sobre todo por llegar y seguir estando. A mis amigos de la prepa: Guss, Pao, Anita y Ximenita, por tanto tiempo de amistad, porque a pesar de vernos una vez al año seguimos estando juntos. A todos ellos, gracias por aportar algo a la persona que soy actualmente.

Una dedicatoria especial a mi media naranja: Solecito. Por ser mi mejor amiga a pesar de la distancia, por acompañarme en un montón de aventuras y nuevas experiencias, por las pláticas tipo lace, por ser mi consejera y apoyarme en las malas decisiones, por conocer nuevos lugares a mi lado, por los puntos de la lista que hemos ido desbloqueando de nuestra amistad, por acompañarme en cada paso importante que doy y simplemente gracias por estar. Te quiero masivo.

Al Dr. Carlos Pedraza, a Andy, Leo, Jess y Gaby del Laboratorio de Entomología Forense de la LCF, por ser parte importante tanto en mi formación como bióloga como en mi desarrollo personal. Por darme los mejores meses de servicio social, por enseñarme tanto y hacerme crecer tanto académica como personalmente y demostrarme que mi futuro siempre será algo relacionado con lo forense.

Y finalmente a Luis Enrique, por ser esa pequeña historia que leeré mil veces. Solo tú sabes lo que en realidad fuiste para mí. Gracias por hacerme crecer, creer en mí y seguir adelante. Ésta tesis también es tuya. Te amo.

*“Lo bueno de la ciencia es que es cierta
independientemente de si crees en ella o no”.*

-Neil Degrasse Tyson

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 La Enfermedad de Chagas	3
1.1.1 Transmisión.....	3
1.1.2 Fases de la enfermedad manifestaciones clínicas y pruebas de diagnóstico	6
1.1.3 Epidemiología.....	8
1.2 Agente causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.2.1 Taxonomía.....	12
1.2.2 Morfología.....	12
1.2.3 Ciclo de vida.....	13
1.2.4 Metacicloogénesis.....	15
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.1.1 Unidades Discretas de Tipificación (DTU's)	22
2.2 Variabilidad biológica	24
2.3 Clonas de <i>T. cruzi</i>	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS.....	29
5. HIPÓTESIS.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Parásitos	30
6.2 Cinética de crecimiento	30
6.3 Inducción de la metacicloogénesis en medio GRACE	31
6.3.1 Ensayo de resistencia al complemento.....	31
6.3.2 Tinción con Giemsa	32
6.4 Infección <i>in vitro</i>	32
6.4.1 Purificación de tripomastigotes por gradiente de percoll	33

6.4.2 Infección de células Vero	33
6.4.3 Tinción de células infectadas con DAPI	34
6.4.4 Fotografías de células infectadas	34
6.5 Caracterización antigénica	34
6.5.1 Extracción proteica por sonicación	35
6.5.2 Cuantificación de proteínas por el método Lowry	35
6.5.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	36
6.5.4 Western blot	36
6.6 Expresión de factores de virulencia.....	38
6.6.1 Extracción de RNA	38
6.6.2 Amplificación de mRNA mediante qRT-PCR	39
6.7 Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Cinética de crecimiento	41
7.2 Inducción de metaclonogénesis.....	43
7.3 Infección <i>in vitro</i>	45
7.4 Perfil proteico.....	49
7.5 Caracterización antigénica	50
7.6 Factores de virulencia	53
8. DISCUSIÓN.....	55
9. CONCLUSIONES	63
10. PERSPECTIVAS.....	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente que causa de la enfermedad de Chagas, la cual es endémica de 21 países de América Latina. Este parásito se encuentra agrupado en cepas, las cuales se encuentran conformadas por clonas debido a la estructura poblacional de la especie que es predominantemente clonal. La heterogeneidad genética entre las cepas ha sido ampliamente estudiada, clasificándose dentro de seis Unidades discretas de tipificación (DTU's). Además de la heterogeneidad genética, un gran número de estudios han demostrado que existe una diversidad biológica entre las cepas del parásito respecto a factores como morfología, crecimiento *in vitro*, capacidad infectiva *in vitro*, tropismo y capacidad de generar lesiones tisulares en modelos *in vivo*, virulencia, entre otros. Se ha demostrado que las cepas pertenecientes al mismo DTU pueden llegar a presentar comportamientos biológicos propios para cada una de ellas, siendo las cepas mexicanas Querétaro (Qro) y Ninoa, pertenecientes al DTU TcI, un ejemplo de esto. Debido a la diversidad presentada a nivel de cepas y a la estructura clonal de las mismas, se ha propuesto que las clonas que constituyen las cepas podrían contar con características biológicas propias para cada una de ellas, existiendo así la dominancia de algunas clonas principales que rigen el comportamiento de la cepa parental. Este es uno de los motivos por el cual, se han realizado diferentes estudios de caracterización biológica y genética de clonas de diferentes cepas, en los que se ha reportado que algunas propiedades biológicas pueden ser compartidas o no entre las clonas y la cepa parental de la que fueron aisladas. Por lo cual, en el presente estudio se evaluó el crecimiento, la capacidad metaciclogénica, la capacidad infectiva, patrones proteicos y antigénicos y los niveles de expresión del gen *t-daf*, en diferentes clonas provenientes de las cepas mexicanas Qro y Ninoa. Los resultados mostraron crecimientos estadísticamente similares para Qro, Ninoa y sus clonas. Respecto a la metaciclogénesis y la infección *in vitro* se observó una tendencia de las clonas a presentar valores mayores a los obtenidos con las cepas parentales, sin ser significativas. Al comparar el patrón de proteínas de los extractos y los antígenos reconocidos por sueros de ratones infectados con las cepas parentales se observaron patrones de proteínas similares entre las clonas y su respectiva cepa parental, resaltando que en el reconocimiento antigénico, al menos en todas las clonas de la cepa Qro, presentaron un antígeno diferente a la parental.

Respecto a la expresión del mRNA de la proteína asociada a virulencia, T-DAF, la mayoría de clonas de Qro presentan mayor expresión que la parental, mientras que en Ninoa, sólo una de las clonas presentó mayor expresión, siendo estas diferencias no significativas. Por todos estos resultados podemos concluir que las clonas analizadas son iguales a la población de la que se originaron.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, la cual fue descrita por el médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909 (WHO, 2018).

T. cruzi presenta varias formas de transmisión, siendo la principal la vía vectorial. El insecto vector, que pertenece a la subfamilia Triatominae, se distribuye ampliamente en 21 países de América Latina en los que la enfermedad es endémica, donde afecta principalmente a la población que presenta déficit socio-económico (OPS, 2018).

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (WHO) (2018) cataloga a la enfermedad de Chagas dentro de la lista de las 15 Enfermedades Tropicales Olvidadas (ETO's), las cuales son un grupo de enfermedades infecciosas y no infecciosas cuya causa principal es la pobreza extrema de las poblaciones humanas que viven en los países en desarrollo. Así mismo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reconoce a la Enfermedad de Chagas y a las geohelmintiasis como las principales ETO's con mayor prevalencia e incidencia en América Latina y el Caribe (Altagracia-Martínez *et al.*, 2012; OPS, 2016).

1.1.1 Transmisión

T. cruzi puede infectar más de 150 mamíferos domésticos y selváticos que son reconocidos como hospederos y reservorios, entre los cuales se encuentra el humano, el perro y otros cánidos, el gato, el tlacuache, el armadillo, el murciélago, entre otros (Teixeira *et al.*, 2011; Rassi *et al.*, 2012). Existen diferentes mecanismos de transmisión: la forma vectorial y las no vectoriales (WHO, 2018).

La vía vectorial es el principal mecanismo de adquisición del parásito en los países endémicos, ésta implica a insectos hematófagos que pertenecen a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), en la que algunas especies han sido registradas como trasmisoras de *T. cruzi* (Rassi *et al.*, 2012). Estos insectos son conocidos con diferentes nombres coloquiales que dependen de la zona geográfica, por ejemplo: chinches besuconas, chinches hociconas, picudas, vinchucas, chipo, etcétera, las cuales se distribuyen en gran parte del continente americano (Fig. 1) (Salazar-Schettino *et al.*, 2005; Schofield y Galvão, 2009; Gourbière *et al.*, 2012).

La transmisión por vía vectorial se lleva a cabo en dos diferentes ciclos, el selvático y el doméstico. En el primero se presenta la interacción de los triatominos con reservorios silvestres. Por otra parte, en el ciclo doméstico se da el contacto de los vectores con los seres humanos debido a la presencia de los insectos en las viviendas donde pueden desarrollar su ciclo de vida completo o pueden estar visitando las casas para alimentarse, siendo pequeños mamíferos, principalmente animales de compañía, la principal fuente de infección (Zingales, 2018).

En este tipo de transmisión, la fase infectiva del parásito se encuentra en las heces del insecto, las cuales son depositadas sobre el hospedero durante o posterior a la alimentación, siendo el lugar de la picadura, las mucosas o alguna laceración, los sitios de acceso del parásito al hospedero (Rassi *et al.*, 2012; Esch y Petersen, 2013).

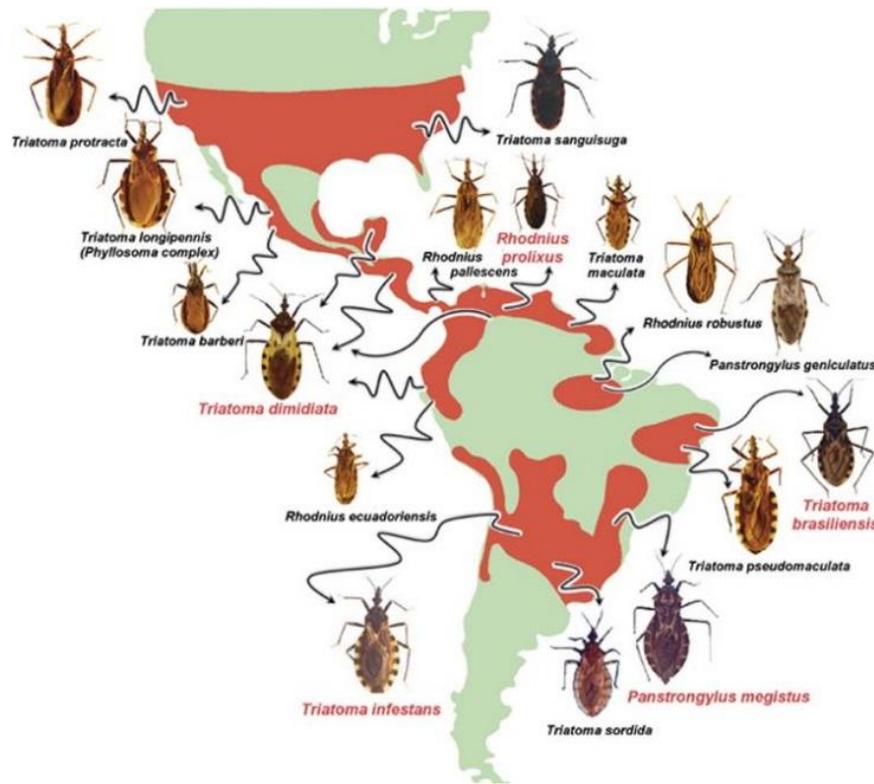


Figura 1. Distribución geográfica de algunas especies de Reduvidos que son vectores de la Enfermedad de Chagas. Figura tomada de Gourbière *et al.*, 2012.

Por otra parte, los mecanismos de transmisión no relacionados a la vía vectorial son: la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos, la transmisión congénita y la vía oral (Rassi *et al.*, 2012; WHO, 2018).

La transfusión sanguínea es una de las principales vías de infección con *T. cruzi* en zonas urbanas y en países donde la enfermedad no es endémica. En estos sitios, el riesgo de adquisición de la Enfermedad de Chagas por una unidad de sangre es de 10-20%, y a su vez, depende de factores como la concentración de parásitos en la sangre donada y de la cepa del parásito (Rassi *et al.*, 2010, 2012).

De igual forma, la transmisión de *T. cruzi* por el trasplante de órganos o de médula ósea que provenga de un donador crónico ha sido reportada tanto en países endémicos como en países no endémicos, estos últimos han presentado un aumento en los casos

confirmados debido a la constante y numerosa migración de la población latinoamericana (Rassi *et al.*, 2010).

La transmisión congénita o vertical presenta prevalencias de 3.5 y 9.7% en mujeres embarazadas en países europeos y de Norteamérica, donde se ha observado un aumento de estos valores debida a la migración humana (González-Tomé *et al.*, 2013). Además, la mayoría de los casos en infantes han sido diagnosticados durante la fase crónica, por lo que, en estos países, gran parte de las muertes atribuidas a complicaciones cardíacas de la Enfermedad de Chagas ocurren en adultos que fueron infectados siendo niños (González-Tomé *et al.*, 2013).

La vía oral es una de las vías de transmisión que ha sido más estudiada recientemente, debido al aumento de reportes de casos humanos confirmados en varios países endémicos. Se encuentra relacionada a la ingesta accidental del vector; al consumo accidental de deyecciones de vectores o de reservorios portadores del parásito; a la ingesta de animales de caza infectados; o al consumo de leche materna de una madre infectada. Esta vía de infección presenta diferencias en las manifestaciones clínicas, en comparación con lo observado en el resto de los mecanismos de transmisión (Toso *et al.*, 2011).

1.1.2 Fases de la enfermedad manifestaciones clínicas y pruebas de diagnóstico

La enfermedad de Chagas se caracteriza por la variedad de signos y síntomas que se presentan. Cuando la infección es adquirida por la vía vectorial, algunos uno de los primeros signos que se llegan a presentar es el Chagoma, que se desarrolla en cualquier sitio de la piel donde entra el parásito, y en el caso de que la entrada del parásito se realice a en la mucosa ocular, se conoce como signo de Romana, la cual desaparece aproximadamente en 15 días (WHO, 2018). Una vez que la infección fue adquirida, las personas infectadas pueden presentar dos fases clínicas: la aguda y la crónica.

Durante la fase aguda las manifestaciones clínicas aparecen alrededor de 8-10 días después de la inoculación del parásito (en caso de que sea por la vía vectorial), o alrededor de 20-40 días en caso de la transfusión sanguínea. En esta fase, los parásitos se encuentran circulando en el torrente sanguíneo. Predominantemente es una fase asintomática, pero llegan a presentarse signos y síntomas que no son exclusivos de la enfermedad, por ejemplo: fiebre acompañada de malestar, anorexia, dolor de cabeza y fatiga. Los principales signos sistémicos que se presentan son el alargamiento de linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia y edemas subcutáneos (Rassi *et al.*, 2010; Álvarez-Hernández *et al.*, 2016; WHO, 2018).

Las principales pruebas de diagnóstico que son utilizadas durante la fase aguda son métodos parasitológicos directos en los que se confirma la presencia del parásito circulando en sangre, por ejemplo: la examinación de muestras frescas de sangre al microscopio para observar al parásito directamente, el xenodiagnóstico en el que se alimenta a un vector con la muestra de sangre y posteriormente se analizan las heces y/o el intestino para observar si hay presencia del parásito, o el hemocultivo (Álvarez-Hernández *et al.*, 2016; Pérez-Molina y Molina, 2018).

El tratamiento de la Enfermedad de Chagas se realiza con fármacos específicos, siendo Nifurtimox y Benznidazol los únicos dos compuestos aprobados para el tratamiento. Su uso es recomendado durante la fase aguda, así como en casos de transmisión congénita y de reactivación por inmunosupresión (Pereira-Nunes *et al.*, 2013; WHO, 2018). Ambas drogas presentan un rango entre un 76 y un 85% de efectividad en casos agudos y un 90% en recién nacidos. Sin embargo, son compuestos que generan reacciones adversas. Se ha descrito que su consumo provoca reacciones de hipersensibilidad en la piel, molestias gastrointestinales, fiebre, neuropatías y leucopenia (Pérez-Molina *et al.*, 2015).

En cuanto a la fase crónica, ésta comienza 2 ó 3 meses después de la adquisición de la infección, para este entonces los síntomas de la fase aguda (si se llegaron a presentar) ya desaparecieron y la presencia del parásito en sangre es indetectable (Rassi *et al.*, 2010). En esta fase, el 60-70% de los casos presentan una forma indeterminada, la cual puede durar

desde meses hasta años. Se caracteriza por la ausencia de signos y síntomas, los exámenes radiológicos del tracto digestivo y los electrocardiogramas se observan normales pero al realizarse pruebas serológicas éstas resultan positivas (Rassi *et al.*, 2010; Pereira-Nunes *et al.*, 2013). El otro 40-30% de los casos llegan a presentar una forma sintomática 10 a 30 años después de la infección, manifestándose daño cardíaco, digestivo o ambos. Asimismo, en el torrente sanguíneo se llegan a detectar parásitos, además de una alta producción de anticuerpos contra el parásito (Rassi *et al.*, 2012).

Las pruebas de diagnóstico utilizadas durante esta fase son métodos serológicos que demuestran la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, por ejemplo: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta o western blot. De igual forma se pueden utilizar pruebas moleculares como una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2016).

1.1.3 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica endémica de 21 países de América Latina. De acuerdo con la WHO, actualmente se calcula que a nivel global existen 8 millones de personas infectadas con *T. cruzi* (WHO, 2018).

Debido a los constantes movimientos migratorios de personas infectadas hacia zonas urbanas y a países no endémicos, en las últimas décadas se ha presentado un aumento en la frecuencia de casos en Estados Unidos de América, Canadá, Australia, Japón, Francia, España y otros países europeos (Fig. 2), cambiando así la epidemiología de la enfermedad (OPS, 2018; WHO, 2018).



Figura 2. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. En color gris claro se muestran los países endémicos de la enfermedad y con otros colores se presentan los países donde ha aumentado el número de registros de casos debido a las diferentes formas de transmisión ajenas a la vía vectorial. Mapa tomado de Rassi. *et al.*, 2010.

Respecto a la situación en México, la enfermedad ha sido registrada en todos los estados de la República (Fig. 3), destacándose los estados de Veracruz, Oaxaca, Jalisco, Chiapas, Morelos y Guerrero (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006). En el año 2014, la Secretaría de Salud dio a conocer los avances sobre el *Programa de Acción Específico para la Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas*. En éste, se reporta que durante el periodo de 2000-2012 se registraron 5463 casos en el país, dentro de los cuales, el estado de Morelos representó la entidad con mayor porcentaje de casos agudos, seguido de Veracruz, Jalisco e Hidalgo. Los estados con mayor índice de casos crónicos fueron Veracruz, Morelos, Guerrero y Jalisco. De igual forma, dentro de este periodo, se registraron 371 defunciones debidas a la Tripanosomiasis americana, las cuales, principalmente se presentaron en Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Ciudad de México y Veracruz (SSA, 2014).

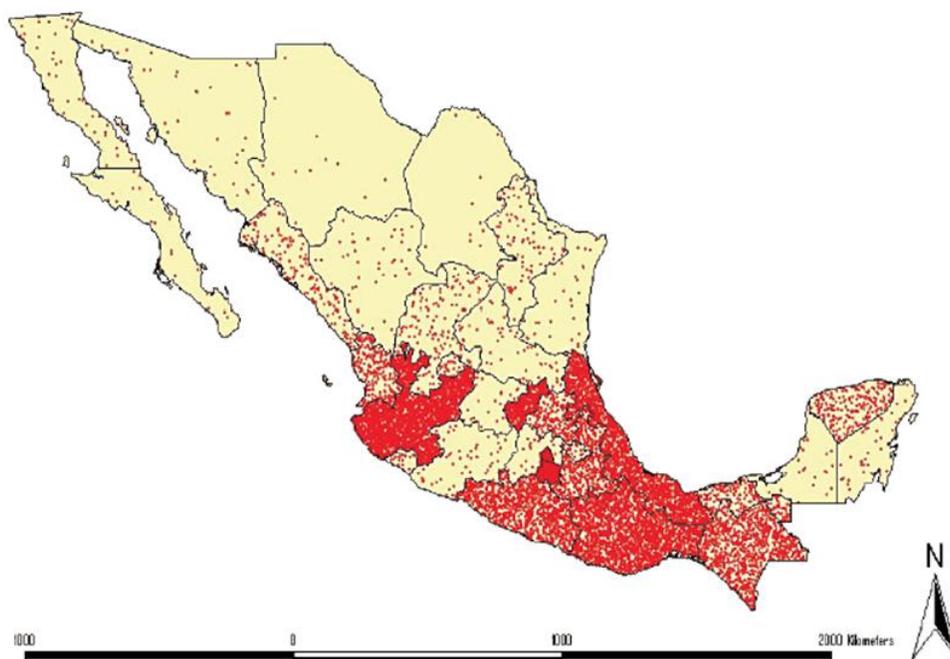


Figura 3. Distribución de todos los tipos de la enfermedad de Chagas en México. Cada punto es un caso. Los puntos representan la densidad media para el estado. Mapa tomado de Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.

Las diferentes condiciones climatológicas, orográficas y los aspectos socio-económicos de México, proporcionan una gran variedad de ambientes con las condiciones óptimas para la transmisión de *T. cruzi*. Siendo así que, los vectores presentan una amplia distribución a lo largo de todo el país, lo cual representa un impacto epidemiológico de la enfermedad, ya que aproximadamente el 96% de la transmisión se ha originado por vía vectorial (Ramsey *et al.*, 2003; Odagiu y Mayer, 2015). Para México, se han reportado 39 especies de insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, de las cuales, 20 han sido encontradas con infección natural con *T. cruzi* (Dumonteil, 1999). De igual forma, un gran número de reservorios han sido identificados dentro del país, en los cuales se reporta una seroprevalencia de la infección con *T. cruzi* de entre 8% al 62% (Dumonteil, 1999; Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

Debido al aumento en la distribución mundial de la enfermedad y su importancia epidemiológica, tanto países endémicos como no endémicos han comenzado diversos

programas para controlar la transmisión del parásito considerando los diferentes mecanismos de transmisión (Coura, 2013). Las medidas básicas que se han aplicado son: la educación de la población respecto a los vectores; el uso de diversos insecticidas con los que se rocían las casas y construcciones anexas donde se pueda encontrar el triatomino; la implementación de diferentes pruebas serológicas dentro de los bancos de sangre para determinar la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en la sangre de donadores; así como la aplicación de diversas medidas de higiene respecto a los alimentos y su debida preparación (Moncayo y Silveira, 2010; Coura, 2013; OPS, 2018).

1.2 Agente causal: *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozooario parásito flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, el cual se caracteriza por la presencia de un organelo conocido como cinetoplasto, que contiene una alta concentración de DNA extranuclear (Fig. 4) (Martins *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2012).

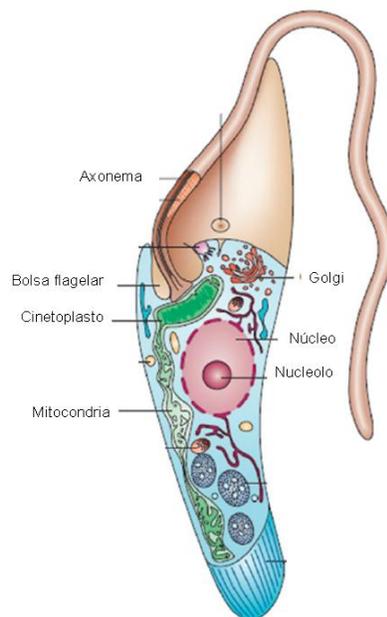


Figura 4. Esquema de la morfología general interna de un epimastigote de *T. cruzi*. Se observan algunas estructuras y organelos. Figura tomada y modificada de de Souza *et al.*, 2010.

1.2.1 Taxonomía

De acuerdo con Rassi y colaboradores (2012), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio	Eukaryota
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Especie	<i>cruzi</i>

1.2.2 Morfología

Durante diferentes momentos del ciclo de vida de *T. cruzi*, se presentan tres estadios principales que se diferencian entre ellos por la posición del cinetoplasto, los cuales son: amastigote, epimastigote y tripomastigote (Martins *et al.*, 2012):

- Amastigote: Forma intracelular de 2 a 6.5 μm de diámetro. Se encuentra en tejido de los hospederos mamíferos. Flagelo y membrana ondulante ausente. Se divide por fisión binaria aproximadamente cada 12 horas (Fig. 5a) (Martins *et al.*, 2012).
- Epimastigote: Estadio replicativo de 20 a 40 μm de longitud. Se caracteriza por el cinetoplasto anterior al núcleo y una membrana ondulante poco desarrollada. Flagelo presente. Se encuentra en el tracto digestivo, orina y heces del vector (Fig. 5b) (Lana *et al.*, 2010).

- Tripomastigote: Forma infectiva que mide entre 12 y 20 μm , sin capacidad de división. Presenta flagelo móvil y una membrana ondulante estrecha. La posición del núcleo es central y el cinetoplasto se encuentra en posición terminal posterior. Los tripomastigotes que se encuentran en la porción final del intestino, en los túbulos de Malpighi, en orina y heces del vector se conocen como tripomastigotes metacíclicos (TM), y los que se encuentran en la sangre y en otros fluidos corporales de los hospederos mamíferos son llamados tripomastigotes sanguíneos (Fig. 5c) (Lana *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012).

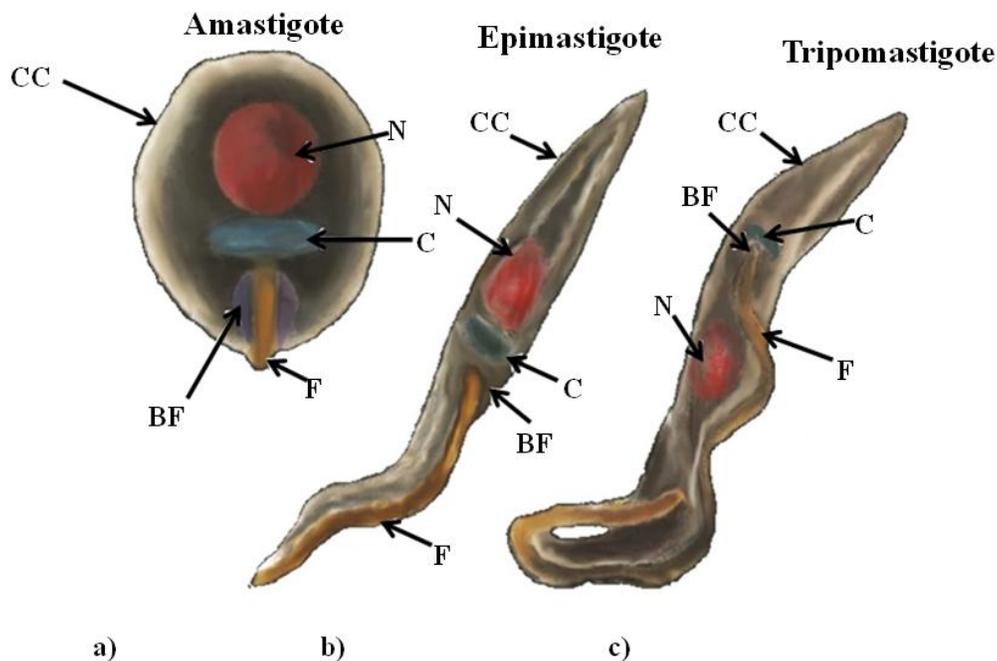


Figura 5. Diferentes estadios de *T. cruzi*. a) Amastigote, b) Epimastigote y c) Tripomastigote. Se señalan las siguientes estructuras: Núcleo (N), Cinetoplasto (C), Flagelo (F), Bolsa flagelar (BF), Cuerpo celular (CC). Figura tomada y modificada de Pech-Canul *et al.*, 2017.

1.2.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Fig. 6) inicia cuando un triatominos se alimenta de sangre periférica de un mamífero infectado con el parásito, ingiriendo así tripomastigotes sanguíneos (Tyler y Endgman, 2001). Éstos se adhieren hidrofóticamente a la pared del

intestino posterior donde presentan diversos cambios morfológicos para así diferenciarse a tripomasigotes metacíclicos, este proceso es denominado metaciclogénesis (Kollien y Schaub, 2000; Tyler y Endgman, 2001). Una vez transformados a esta fase, los parásitos se despegan y son excretados en la orina y heces. Los TM son transmitidos al mamífero a través de las heces del triatomino, las cuales son depositadas sobre el hospedero al momento de la alimentación. Los parásitos entran al torrente sanguíneo por acción mecánica por parte del hospedero, que al rascarse arrastra las heces hacia heridas y/o mucosas.

Dentro del hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos tienen la capacidad de invadir células como macrófagos, miocitos, neuronas y células del epitelio. La entrada a las células blanco es mediante fagocitosis, presentando el reclutamiento de lisosomas que se fusionan con la membrana plasmática, formando así la vacuola parasitófora (Tyler *et al.*, 2003). Dentro de la vacuola, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes debido a la acidificación de la misma. Éstos salen de la vacuola y proliferan en el citoplasma. Posteriormente, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales lisan las células debido a su alta densidad y movimiento, siendo así liberados al espacio extracelular, teniendo la oportunidad de infectar nuevas células y circular en el torrente sanguíneo, donde pueden ser ingeridos por un nuevo vector y de esta manera reiniciar el ciclo de infección (Martins *et al.*, 2012).

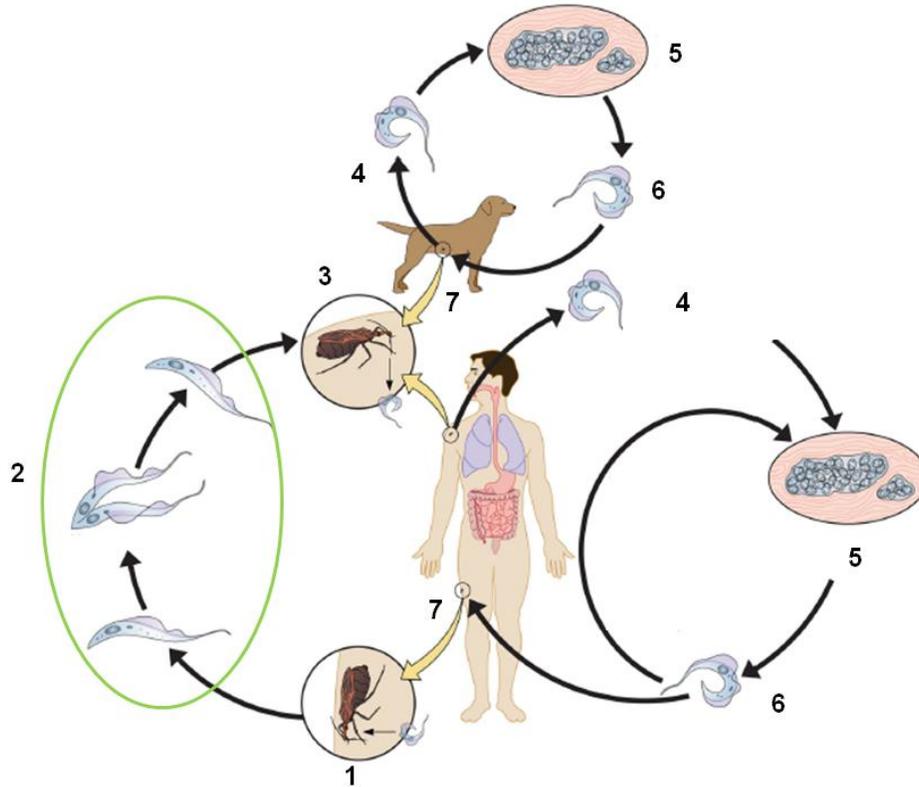


Figura 6. Ciclo de vida de *T. cruzi*. (1) El triatomino ingiere al parásito de la sangre de un mamífero infectado, (2) a lo largo del tracto digestivo del vector el parásito se transforma en epimastigotes y posteriormente a tripomastigotes metacíclicos. (3) Éstos son transmitidos a un nuevo hospedero en las heces del vector, las cuales son depositadas en el mamífero durante la alimentación del insecto. (4) Los parásitos penetran por mucosas o laceraciones y (5) dentro del hospedero invaden células en las que se diferencian a amastigotes. (6) Éstos se replican por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos. La célula hospedera es lisada y de esa forma se liberan a torrente sanguíneo, (7) donde el triatomino puede ingerir los parásitos y así reiniciar el ciclo. En color verde se señala el proceso de la metaciclogénesis. Figura tomada y modificada de Esch y Petersen, 2013.

1.2.4 Metaciclogénesis

A través del tracto digestivo del vector se presentan diversas modificaciones morfológicas en los parásitos. Específicamente en el recto, se lleva a cabo un proceso fundamental en el ciclo de vida de *T. cruzi* denominado metaciclogénesis. Ésta consta de la transformación de epimastigote a tripomastigote metacíclico (Kollien y Schaub, 2000; Tyler *et al.*, 2003).

Existen varios estudios en los que se reportan diferentes características propias del microambiente dentro del recto del vector que afectan directamente el proceso de metacicloogénesis, por ejemplo la adhesión de los epimastigotes al recto, la temperatura, el valor de pH del tracto digestivo, el estado nutricional del vector y la cepa del parásito, entre otros (Böker y Schaub, 1984; Kollien y Schaub, 2000).

La metacicloogénesis es un proceso que puede ser replicado en condiciones de laboratorio, para ello se utilizan diferentes medios de cultivo que simulan el ambiente al que se encuentra expuesto el parásito a lo largo del intestino del vector. En estos casos, al igual que en el vector, se han identificado condiciones que influyen en este proceso, como la adhesión de los epimastigotes al sustrato, la temperatura de incubación, el valor de pH del medio de cultivo, la cantidad de parásitos utilizados, el tiempo de incubación, la cepa del parásito, entre otros (Castellani *et al.*, 1967; Contreras *et al.*, 1985; Jiménez-Ortíz *et al.*, 1987; Figueiredo *et al.*, 2000).

Durante la metacicloogénesis, se presentan diferentes cambios fenotípicos y estructurales, uno de los principales es la reposición del cinetoplasto y el flagelo respecto al núcleo (Fig. 7) (Gonçalves *et al.*, 2018).

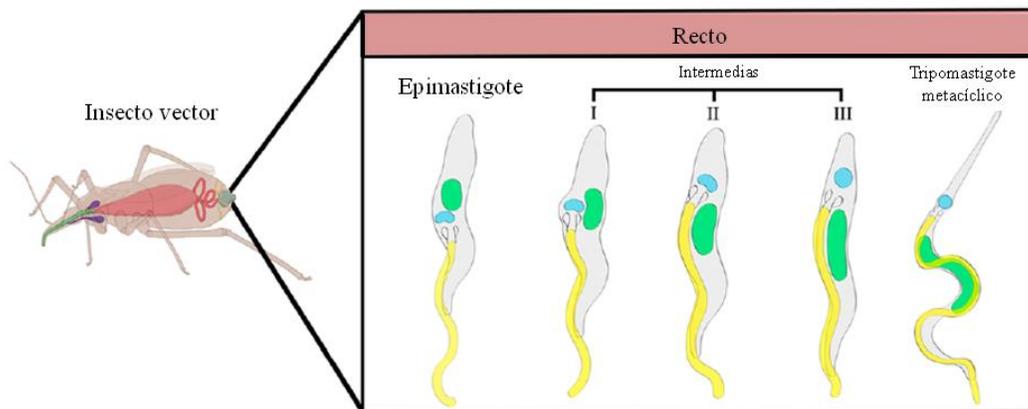


Figura 7. Proceso de metacicloogénesis en el recto del vector. En el recto del vector se encuentran diferentes fases intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes, a través de las cuales se van desarrollando diferentes cambios morfológicos respecto a la posición del cinetoplasto y del flagelo. Figura tomada y modificada de Gonçalves *et al.*, 2018.

Otro de los cambios fundamentales que se presentan durante este proceso es la síntesis y expresión de proteínas y moléculas que presentan un papel importante para la interacción con las células hospederas, para la invasión de las mismas y evadir el reconocimiento del sistema inmune, específicamente la inhibición o interrupción de las diferentes vías de activación del sistema del complemento (Tyler *et al.*, 2003; De Pablos y Osuna, 2012). Este sistema está formado por una red de proteínas que circulan en sangre o se encuentran unidas a la membrana celular, cuya función es reconocer diferentes patrones o antígenos patógenos asociados a patógenos. El sistema del complemento puede ser activado por tres diferentes vías (Fig. 8a): la clásica, la de las lectinas y la alternativa, las cuales llevan a la formación de un complejo de ataque a la membrana (MAC) que media la lisis osmótica de la célula blanco (Tapia *et al.*, 2012; Carroll, 2004; Ramírez-Tolosa y Ferreira, 2017).

Dentro de las moléculas de *T. cruzi* que le permiten evadir al complemento se encuentran la proteína inhibidora del receptor C2 del complemento tri-funcional (CRIT), la calreticulina de *T. cruzi* (CRT), la proteína reguladora del complemento (CRP), la glicoproteína 58/68 y el factor acelerador del decaimiento de tripomastigotes de *T. cruzi* (T-DAF), (Fig. 8b), las cuales, le confieren al parásito la capacidad de evitar la lisis mediada por este sistema (Tapia *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2016).

T-DAF es una glicoproteína de membrana de 87 a 93 kDa que se encuentra presente en tripomastigotes metacíclicos, sanguíneos y de cultivo (Tambourgi *et al.*, 1993; Osorio *et al.*, 2012). Presenta similitudes funcionales, bioquímicas y genéticas con la DAF humana (Tamborgi *et al.*, 1993). Está relacionada con las vías alterna y clásica del sistema del complemento, en las cuales interviene en el correcto ensamblaje de las C3 y C5 convertasas, bloqueando así la vía de activación (Fig. 8b) (Joiner *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 2012; Ramírez-Tolosa y Ferreira, 2017).

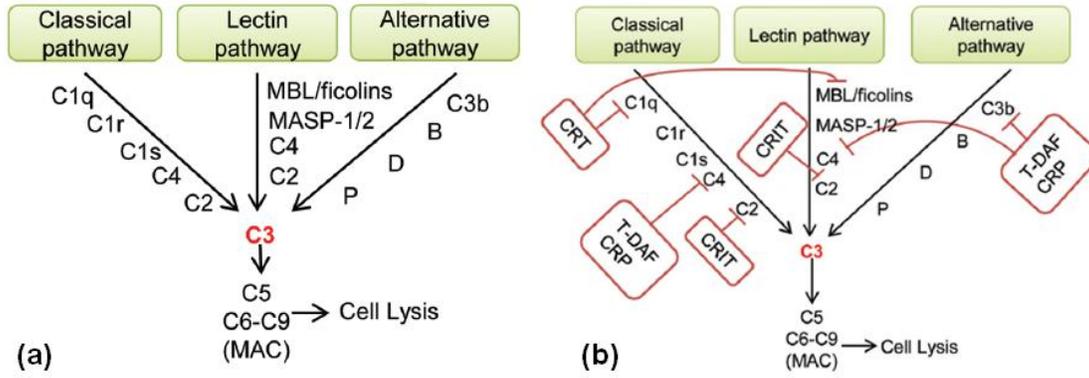


Figura 8. El sistema de complemento y la interacción de *T. cruzi*. Esquema de las a) Vías de activación del sistema del complemento de mamíferos. b) Moléculas expresadas por *T. cruzi* que inhiben al sistema del complemento. Figura tomada y modificada de Arroyo-Olarte *et al.*, 2018

2. ANTECEDENTES

2.1 Genética de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es una especie que se encuentra conformada por diversas cepas, cuya heterogeneidad genética ha sido conocida desde el descubrimiento de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2010). Las cepas presentan una estructura poblacional clonal, es decir, que todos los genotipos descendientes son virtualmente idénticos a los del genotipo inicial (Tibayrenc y Ayala, 2002; Zingales *et al.*, 2012), cuyas poblaciones se encuentran subdivididas en clonas naturales, las cuales son separadas entre ellas por la acumulación de cambios evolutivos al azar (Laurent *et al.*, 1997). Sin embargo, la coexistencia de varias cepas en un mismo hospedero o vector ha sido demostrada tanto de forma experimental como en situaciones naturales (Pinto *et al.*, 2000), favoreciendo así la generación de eventos de recombinación entre las diferentes cepas (Fig. 9), contribuyendo así a la heterogeneidad genética, la cual, a su vez puede influir en el comportamiento biológico (Dvorak, 1984; López-Olmos *et al.*, 1998; Machado y Ayala, 2001).

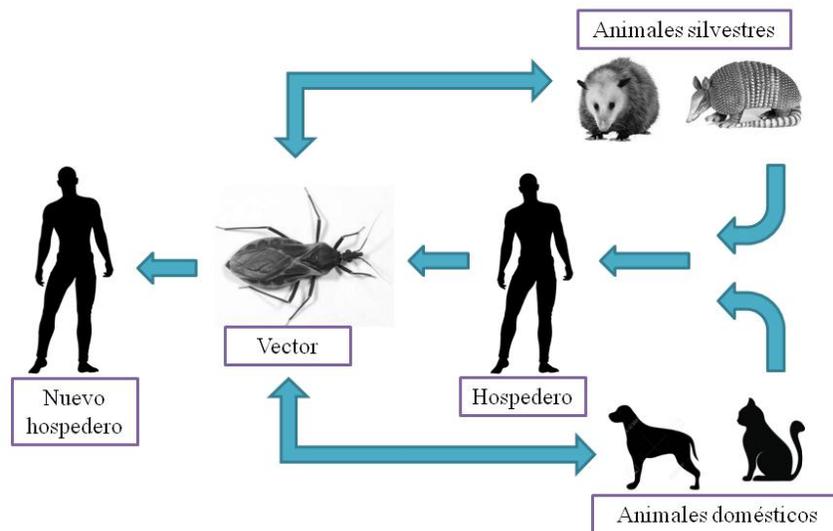


Figura 9. Proceso de reinfección en la naturaleza con *T. cruzi*. Las cepas se encuentran circulando entre reservorios, vectores y hospederos. Un solo triatominos puede ingerir al parásito de un animal silvestre y después ingerirlo de un animal doméstico o de un ser humano, presentando así una mezcla de cepas, las

cuales van a llegar a un nuevo hospedero sano. De igual forma se desarrolla cuando el vector infecta a algún animal doméstico o uno silvestre. Figura elaborada por Trejo-Mellado A.

A lo largo del tiempo, han existido diferentes nomenclaturas utilizadas para clasificar a las cepas de *T. cruzi*, entre los que se encuentran: zimodemos por la variabilidad entre los perfiles isoenzimáticos; esquizodemos por las diferencias en los perfiles con el uso de minicírculos para kDNA; biodemas por las diferencias observadas en modelos *in vivo* y clonets que son agrupaciones de cepas que con ciertos marcadores moleculares son indistinguibles entre sí (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Machado y Ayala, 2001; Muñoz *et al.*, 2013). La electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) se ha empleado para tipificar a las cepas del parásito, determinando que la población de *T. cruzi* se encontraba dividida en dos grandes linajes nombrados TcI y TcII; de este último, a través de ensayos RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) se demostró la existencia de cinco subdivisiones que se denominaron TcIIa – TcIIe (Barnabé *et al.*, 2000; Bosseno *et al.*, 2000).

Posteriormente, en el 2009, un grupo de investigadores expertos en tipificación del parásito, decidieron unificar la nomenclatura para poder clasificar las cepas de *T. cruzi*, por lo cual se comenzó a utilizar el concepto de DTU's (*Discrete Typing Units*). Los DTU's son grupos de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí y que son identificables por marcadores genéticos e inmunológicos (Zingales *et al.*, 2009). Los DTU's se denominaron TcI, TcII (anteriormente TcIIb), TcIII (anteriormente TcIIc), TcIV (anteriormente TcIIa), TcV (anteriormente TcIId), TcVI (anteriormente TcIIe) y recientemente se anexó Tcbat.

Existen diferentes teorías para explicar el origen de los diferentes DTU's, que consideran eventos de reproducción sexual, hibridación, y la introgresión mitocondrial (Lewis *et al.*, 2011). El estudio de genes nucleares y mitocondriales ha permitido encontrar cepas que presentan éste tipo de genes híbridos, dando pauta a la posibilidad de la presencia de una reproducción sexual o parasexual en las poblaciones de *T. cruzi*, al menos en los DTU's TcV y TcVI (Lewis, *et al.*, 2011).

En cuanto a la hibridación, existen dos modelos que explican el intercambio genético entre DTU's parentales o ancestrales, cuyos híbridos propiciaron el origen de dos genotipos que son muy similares entre sí: TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2012):

- a) El modelo de dos hibridaciones fue propuesto por Westernberger y colaboradores (2005). Ellos secuenciaron algunos genes de histonas, proteínas de choque térmico, una proteína de unión a calcio y de la glucosa fosfato isomerasa, concluyendo la existencia de dos genotipos (TcI y TcII), derivados de un *T. cruzi* común. A partir de dichos genotipos, se presenta un primer evento de hibridación que da como resultado una progenie híbrida, la cual presentará una pérdida de heterocigocidad, seguida de una evolución clonal independiente que origina a los DTU's nuevos, TcIII y TcIV. Posteriormente, una segunda hibridación se presenta entre TcII y TcIII, cuyos genotipos derivados son muy similares, presentan alelos heterocigóticos y un mosaico de genes parentales y posteriormente se presenta una evolución clonal independiente (Fig. 10a).

- b) El modelo de tres ancestros fue propuesto por Freitas y colaboradores (2006). Ellos genotipificaron varias cepas con el uso de marcadores mitocondriales y nucleares, en las que encontraron tres haplogrupos principales, TcI (Z/Z), TcII (X/X) y TcIII (Y/Y), propuestos como los genotipos principales que derivaron del mismo *T. cruzi* ancestral. Las cepas de TcV y TcVI analizadas presentaron haplotipos híbridos (X/Y) que son resultado de dos hibridaciones independientes y posteriormente se presentó un evento de evolución clonal independiente. Se propone que las cepas pertenecientes al DTU TcIV surgieron por una divergencia independiente, debido a que no presentaron coincidencias con los haplotipos encontrados (Fig. 10b).

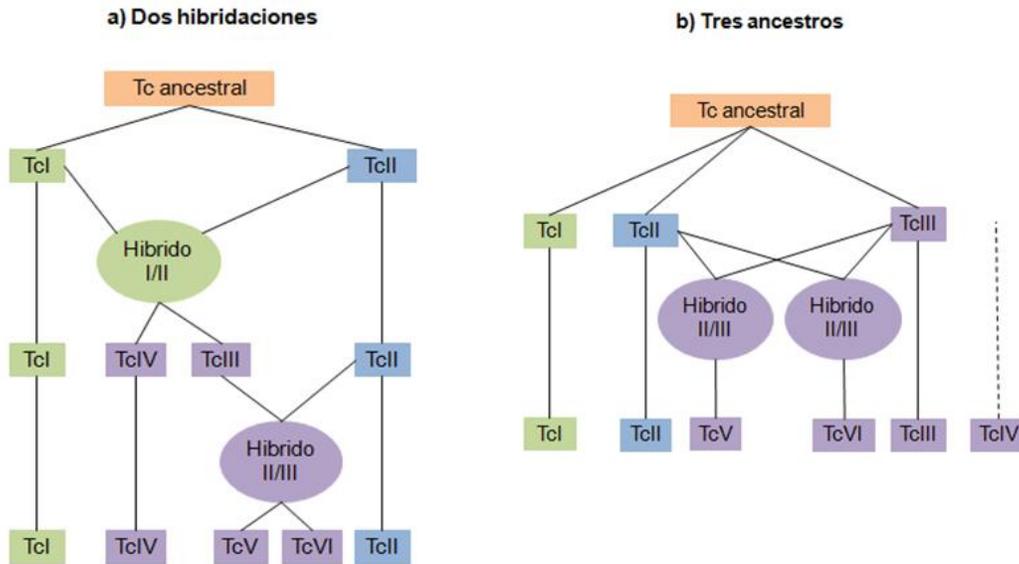


Figura 10. Modelos de hibridación de intercambio genético durante la evolución clonal de *T. cruzi*. a) Modelo dos hibridaciones y b) Modelo tres ancestros. Figura elaborada a partir de Westernberger *et al.*, 2005 y Freitas *et al.*, 2006.

Respecto a la teoría de la heterogeneidad debida a la introgresión mitocondrial, se basa en las diferencias observadas en secuencias de genes mitocondriales de cepas de diferentes DTU's. En éstos se ha observado una mezcla de los mismos, y de igual forma se ha reportado que el entrecruzamiento o intercambio del material mitocondrial no interfiere con el material nuclear (Machado y Ayala, 2001; Lewis *et al.*, 2011; Messenger *et al.*, 2012).

2.1.1 Unidades Discretas de Tipificación (DTU's)

A partir de que la heterogeneidad genética de las cepas del parásito comenzó a ser estudiada, ha sido considerada como uno de los factores relacionados con las manifestaciones de la enfermedad, motivo por el cual se ha tratado de encontrar una relación entre los diferentes DTU's y el origen biológico de los aislados, la distribución geográfica de los DTU's y las manifestaciones clínicas reportadas. Sin embargo, debido a cambios en la historia evolutiva del parásito, los cambios ecológicos de las poblaciones de

hospederos y cambios antropogénicos, dichas relaciones no han sido completamente comprobadas. Sin embargo, si se ha demostrado que existe una tendencia de comportamiento (Zingales *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013; Zingales, 2018).

TcI es el DTU con mayor abundancia en el continente americano coincidiendo con la distribución geográfica del vector. Se ha encontrado relacionado tanto al ciclo selvático como al doméstico, produciendo en este último cardiomiopatía chagásica en infecciones humanas (Zingales *et al.*, 2012).

TcII predomina principalmente en América central y en las regiones centro y sur de Sudamérica. Está asociado con manifestaciones cardíacas y la presencia de megasíndromes en colon y esófago. Ha sido reportado mayoritariamente en casos domésticos, pero ha sido aislado también de roedores y algunos primates (Zingales *et al.*, 2012; Zingales, 2018).

El DTU TcIII ha sido reportado principalmente en Brasil y países de Sudamérica, en los cuales se asocia principalmente al ciclo selvático, aunque ha sido raramente reportado en casos humanos y en perros domésticos. El principal reservorio del que ha sido aislado es el armadillo (Zingales *et al.*, 2012).

TcIV es de los DTU's que presenta una amplia distribución a lo largo del continente americano. Está asociado principalmente al ciclo selvático, siendo el mapache su principal reservorio en la parte norte del continente, mientras que en la parte sur lo son los coatíes y diversos primates. Ha sido reportando en gran porcentaje de animales domésticos, principalmente en perros en Argentina y en casos de transmisión oral en Brasil (Zingales, 2018).

Los DTU's TcV y TcVI están relacionados a casos humanos en países del centro y sur de Sudamérica. Actualmente no están definidos sus principales reservorios, sin embargo se han encontrado en perros en una región de Argentina (Zingales *et al.*, 2012; Zingales, 2018).

Recientemente, se propuso y aceptó un nuevo DTU denominado Tcbat, el cual ha sido aislado de murciélagos en el centro y sureste de Brasil y posterior a su descubrimiento se presentaron reportes en otros países como Panamá, Colombia y Chile. A diferencia de los otros DTU's, Tcbat no se desarrolla en triatomíneos criados en laboratorio, y se ha inferido que los cimicidos (chinchas de cama) son potenciales vectores para este DTU (Marcili *et al.*, 2009; Zingales, 2018).

2.2 Variabilidad biológica

Además de la diversidad genética de *T. cruzi*, un gran número de estudios han demostrado que también existe una diversidad biológica entre las poblaciones del parásito respecto a factores como la morfología, el crecimiento *in vitro*, la capacidad infectiva *in vitro*, tropismo tisular, capacidad de generar lesiones en modelos *in vivo*, virulencia, entre otros (Guzmán-Marín *et al.*, 1999). Lo anterior, se ha relacionado con las manifestaciones clínicas, las cuales varían de acuerdo a la cepa y la genética del paciente, principalmente.

Además de las diferencias biológicas observadas entre DTU's, algunos estudios demuestran que las cepas pertenecientes al mismo DTU pueden llegar a presentar comportamientos biológicos propios para cada una de ellas. Este es el caso de las cepas mexicanas Querétaro (Qro) y Ninoa, pertenecientes al TcI, las cuales han sido ampliamente estudiadas. Espinoza y colaboradores (2010) compararon la respuesta de estas cepas en un modelo murino, donde encontraron que los valores de parasitemia de la cepa Qro fueron dos veces mayores que los presentados por Ninoa. De igual forma, Qro provocó una mortalidad de entre 60 – 100% de los ratones infectados, a diferencia de Ninoa, que no ocasionó una mortalidad significativa.

Asimismo, en las cepas Qro y Ninoa se ha evaluado los niveles de expresión de genes que codifican diferentes proteínas relacionadas con la resistencia al sistema del complemento. En este estudio, Arroyo-Olarte y colaboradores (2018) observaron que la cepa Ninoa presenta una mayor susceptibilidad a la lisis mediada por complemento y

aproximadamente tres veces menor expresión de mRNA de los genes *crp*, *t-daf* y *crit* en comparación con la cepa Qro.

2.3 Clonas de *T. cruzi*

Como se mencionó anteriormente, las cepas del parásito se encuentran conformadas por clonas, ya que, a pesar de que las cepas pertenezcan a un mismo DTU, esto no implica que todos sus miembros sean genéticamente idénticos, motivo por el cual las cepas se deben considerar como familias de clones que presentan una estrecha relación y no como una población conformada por una sola clona (Zingales *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013).

Debido a la diversidad presentada a nivel de cepas y a la estructura clonal de las mismas, se ha propuesto que las clonas que constituyen las cepas podrían contar con propiedades biológicas particulares para cada una de ellas, existiendo la posibilidad de la dominancia de algunas clonas respecto al resto, que determinan el comportamiento de la cepa parental (Tibayrenc y Breniere, 1988; Andrade, 1999; Campos *et al.*, 1999). La presencia de una clona dominante en las cepas aisladas de una región geográfica específica contribuiría al conocimiento de las manifestaciones clínicas y de la reacción de la enfermedad ante fármacos (Andrade, 1999). Este es uno de los motivos por el cual se han realizado diferentes estudios de caracterización biológica y genética de clonas de diferentes cepas. De igual forma, los cultivos de las clonas representan una población que es genotípicamente homogénea, por lo cual han sido utilizadas para la realización de estudios comparativos.

Diferentes parámetros han sido evaluados y comparados entre clonas y sus cepas parentales, por ejemplo la metaciclologénesis. Un estudio realizado por Avendaño y colaboradores (2006) en el que se comparó el porcentaje de TM y el radio tripomastigote/epimastigote a diferentes tiempos de incubación en el medio TAU-P, entre clonas (TC-4 α , TC-4 β y TC-4 π) y su cepa parental (TC-4), mostró diferencias significativas a las 72 y 96 horas de incubación en el medio. De igual forma, los autores reportaron que

entre las clonas, TC-4 β y TC-4 π fueron las que presentaron menor transformación a TM con este medio. Otro parámetro evaluado en este estudio fue la concentración de TM por mililitro, observarse la misma tendencia de comportamiento tanto de las clonas como de la parental, no obstante, no se observaron diferencias significativas; atribuyéndose que la infectividad de esta cepa puede estar condicionada por las variaciones entre las clonas de la misma.

Otro de los parámetros más evaluados en clonas es su comportamiento en un modelo murino. Un ejemplo es el estudio realizado por Melnikov *et al.*, (2013), en el cual evaluaron el tropismo tisular de la cepa Albarrada de origen mexicano y su clona C104, encontrando que la parental presentó mayor tropismo hacia músculo cardiaco, a diferencia de la clona, que presentó mayor infiltrado tisular en músculos como el abdominal y el femoral; los autores atribuyen estas diferencias a la estructura multiclonal de la cepa parental, ya que dentro de ella algunas de las clonas pueden contribuir al tropismo.

En contraste, existen estudios en los que se ha demostrado que las cepas presentan una homogeneidad clonal. Éste es el caso de la cepa Colombiana y siete clonas aisladas de la misma (Col-C1, Col-C5, Col-C8, Col-C10, Col-C13, Col-C14, Col-C15), en las cuales se evaluaron la morfología de los parásitos en sangre periférica de ratones infectados, parasitemia, perfil isoenzimático e histotropismo. Los autores observaron el mismo patrón patológico (histotropismo, virulencia, parasitemia) entre las clonas y la cepa parental, sin embargo, las clonas C-13 y C-14 mostraron una tendencia de tener mayor grado de virulencia y altos niveles de parasitemia. Respecto a los patrones de isoenzimas, tanto las clonas como la cepa parental, presentaron el mismo perfil presentando un perfil de zimodemo 1 (Camandaroba *et al.*, 2006).

Además de los estudios comparativos entre cepas parentales y clonas, estas últimas, al ser poblaciones homogéneas, han sido utilizadas como modelo para diferentes estudios. Un ejemplo es el realizado por Díaz y colaboradores (2011), en el que se compararon extractos proteicos de amastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo pertenecientes a clonas obtenidas de un aislado (TcI) de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica.

De igual forma, algunos estudios han utilizado clonas para tener una homogeneidad genética, por ejemplo, Kessler y colaboradores (2013) utilizaron a la clona Dm28c para la construcción de parásitos fluorescentes con la expresión del gen de GFP y Sánchez-Valdéz *et al.*, (2013), quienes analizaron el papel de la calreticulina en una clona de la cepa TCC a la cual le realizaron delecciones monoalélicas de este gen.

Por otra parte, las clonas son modelo en el estudio de la respuesta de *T. cruzi* ante compuestos anti-parasitarios. Un ejemplo es lo reportado por dos Santos y colaboradores (2012) en el cual utilizaron parásitos pertenecientes a la clona CL-B5 para observar el efecto tripanocida de un extracto en etanol de la planta *Eugenia jambolana*. De igual forma, Campos *et al.*, (2014) analizaron mecanismos relacionados a la resistencia a benznidazol utilizando tres clonas (Clona 1, 2 y 3) pertenecientes a la cepa Y, las cuales fueron obtenidas a partir de una población seleccionada y expuesta a diferentes concentraciones de benznidazol. En este estudio se observó que las clonas presentaron mayor resistencia a benznidazol y nifurtimox que la cepa parental, lo cual relacionan con una mutación (transición) presente en la secuencia del gen de la TcNTR (*mitochondrial NADH-dependent type-I nitroreductase*) en las clonas.

Debido a la evidencia de que las cepas pueden estar conformadas por poblaciones de clonas homogéneas o heterogéneas, es importante estudiar y caracterizar diferentes clonas, ya que esto permitiría conocer y comprender la patogenia de la enfermedad de Chagas de diferentes regiones geográficas.

3. JUSTIFICACIÓN

La heterogeneidad genética y la estructura clonal de las cepas de *T. cruzi* dio pauta al estudio de sus implicaciones biológicas, demostrando la existencia de una variabilidad entre cepas. Se han realizado estudios de clonas de diferentes cepas que han demostrado diferentes parámetros biológicos, los cuales pueden o no ser compartidos entre las cepas y sus clonas constitutivas. En el caso de las cepas mexicanas, se desconoce su biología a nivel de clonas, lo cual podría dar pauta para poder entender un poco más la patogenia de las cepas mexicanas y a su vez, brindar información al estudio de la biología de *T. cruzi*. Por lo anterior, en este trabajo se analizarán las clonas de las cepas Qro y Ninoa que pertenecen al mismo DTU (TcI), las cuales presentan una variabilidad entre ellas (Andrade, 1999; Avendaño *et al.*, 2006; Camandaroba *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2010; Melnikov *et al.*, 2013).

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existe variabilidad entre las cepas parentales y las clonas de *Trypanosoma cruzi* obtenidas a partir de las cepas mexicanas Qro y Ninoa.

Objetivos particulares

- a) Comparar el crecimiento entre las diferentes clonas y las cepas parentales.
- b) Determinar el porcentaje de metacicloogénesis de las clonas.
- c) Cuantificar el grado de infección *in vitro* de las clonas.
- d) Determinar si existe heterogeneidad proteica y antigénica entre las diferentes clonas.
- e) Evaluar los niveles de expresión de un factor asociado a la resistencia al sistema del complemento de las clonas y las cepas parentales.

5. HIPÓTESIS

Las cepas de *T. cruzi* están conformadas por clonas heterogéneas, por tanto, las clonas derivadas de las cepas Qro y Ninoa podrán presentar diferencias biológicas respecto a la cepa parental.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Parásitos

Se utilizaron parásitos de cuatro clonas (Q4, Q6, Q8 y Q11) de la cepa Querétaro (Qro) (TBAR/MX/0000/Queretaro), aislada del vector *Triatoma barberi*, obtenida en el estado de Querétaro y dos clonas (N1 y N4) de la cepa Ninoa (MHOM/MX/1994/Ninoa), obtenida de un caso humano en el estado de Oaxaca. Las clonas fueron obtenidas previamente en el laboratorio mediante las técnicas de clonación en agar sangre y dilución limitante (Reporte de Servicio Social de Nieto-Landaverde). Se utilizó la cepa Qro y Ninoa como cepas parentales (PQ y PN, respectivamente). Los parásitos fueron cultivados e incubados a 28°C en medio LIT (*Liver Infusion Triptose*) (NaCl 68 mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 53.6 mM, Glucosa 1 mM; Triptosa e Infusión de caldo de hígado), complementado con 25 µg/ml de hemina y 10% de suero fetal bovino, de donde se tomaron los parásitos necesarios para realizar los experimentos posteriores.

6.2 Cinética de crecimiento

A partir de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial, con una concentración de 1×10^6 parásitos/ml, se tomaron 10 µl y se realizó una dilución 1:50 con PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Posteriormente se colocaron 10 µl en una cámara de Neubauer y con ayuda del microscopio óptico Reichert U.S.A a 40x, se observaron y contaron los parásitos viables. De los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer se consideraron 16 cuadros totales para la cuantificación. Los parásitos se contaron los días 2, 4, 7, 9, 11 y 14 de crecimiento. Lo anterior se realizó en tres ensayos independientes. Con el fin de estimar el número total de parásitos por cada mililitro, se utilizó la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de parásitos} = (P) \times (10) \times (1000) \times (D)$$

donde:

P= Parásitos contados en los 16 cuadros

10= Volumen en μl colocados en la cámara de Neubauer

1000= Factor de conversión a ml

D= Factor de dilución

6.3 Inducción de la metacicloogénesis en medio GRACE

Se utilizaron cultivos de epimastigotes con una concentración de 5×10^6 parásitos/ml en un volumen de 25 ml, los cuales se incubaron 9 días en medio LIT. Los cultivos se suspendieron y contaron los parásitos en una dilución 1:50 con cámara de Neubauer como se describió previamente. Después se colectaron por centrifugación a 2000xg durante 15 minutos a 4°C para retirar el medio y se lavaron dos veces con PBS estéril. La pastilla celular se suspendió en 4 ml de medio GRACE (Gibco, Cat. 11300-043) previamente calibrado a pH 1.5 con HCl seguido de NaOH para llevarlo a un pH final de 5.8 y nuevamente se contaron los parásitos con una dilución 1:100 con PBS. Finalmente se llevó a una concentración de 250×10^6 parásitos/ml en medio GRACE y se incubaron los cultivos durante cuatro días a 28°C.

6.3.1 Ensayo de resistencia al complemento

El ensayo se realizó a partir de un cultivo de cuatro días de incubación en medio GRACE con una concentración de 250×10^6 parásitos/ml. Para evaluar la resistencia al complemento se utilizaron tres condiciones: parásitos expuestos a suero de cobayo, parásitos expuestos a suero de cobayo inactivado (56°C por 30 minutos) y medio GRACE. Los cultivos se homogeneizaron y contaron en una dilución 1:10 con PBS. Se llevaron a una concentración de 51×10^5 parásitos en 510 μl de medio GRACE y a partir de éstos, se colocaron 170 μl en tres microtubos y se le adicionaron 170 μl de suero o medio para tener

las tres condiciones antes mencionadas. De cada condición se realizaron tres alícuotas de 100 µl para tener triplicados de cada una y se incubaron durante 1 hora a 28°C. Transcurrido el tiempo, se realizó una dilución 1:10 de cada alícuota con PBS para contar los tripomastigotes metacíclicos sobrevivientes. Se realizaron tres ensayos independientes.

6.3.2 Tinción con Giemsa

En un portaobjetos Teflon Printed Slide de 21 pozos (Electron microscopy sciences, Cat. 63429-04) se colocaron 10 µl de un cultivo de parásitos de cada cepa parental y las clonas que se encontraban en medio LIT (epimastigotes, antes de inducir la metaciclogénesis) y en medio GRACE después de haberlos incubado durante 4 días. Se dejó secar a temperatura ambiente. Después se fijaron los parásitos con metanol (JT Baker, Cat 9070-03) y se dejó secar. Se adicionó posteriormente 20 µl de Giemsa (Sigma, Cat. WG32) y se incubaron en cámara húmeda por 15 minutos. Pasado el tiempo se lavó con PBS pH 7.2 por 10 minutos sin agitar. Para retirar el exceso de colorante se colocó la laminilla en agua corriente de flujo moderado durante 5 segundos, se repitió el lavado con PBS a pH 7.2 y se dejó secar a temperatura ambiente.

6.4 Infección *in vitro*

Se utilizó la línea celular Vero: fibroblastos de riñón de mono africano verde (*Cercopithecus aethiops*). Se utilizó un portaobjetos Teflon Printed Slide de 21 pozos (Electron microscopy sciences, Cat. 63429-04) donde se sembraron 6000 células en 30 µl de medio D-MEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*) (Invitrogen Cat. 12100-046) por pozo y se dejaron adherir durante 6 horas a 37°C y 5% de CO₂.

6.4.1 Purificación de tripomastigotes por gradiente de percoll

Se partió de un cultivo de cuatro días de incubación en medio GRACE, el cual contaba con las condiciones utilizadas para la inducción de la metacicloogénesis previamente descritos. Se colectaron los parásitos por centrifugación a 2500xg por 10 minutos a 25°C. La pastilla celular se suspendió en un volumen de 2.5 ml de medio GRACE y se adicionó 2.5 ml de suero fresco de cobayo (proporción 1:1) y se incubaron las clonas y la cepa parental de Qro por 4 horas y las clonas y parental de Ninoa por 2 horas, ambas a 28°C. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 2500xg y la pastilla se suspendió en 1 ml de PBS. Se formó un gradiente de percoll (GE Healthcare, Cat. 17-0891-01), con soluciones al 15%, 40% y 80% agregando las capas de percoll de mayor a menor porcentaje una sobre otra (1.5 ml de cada una) y al final la suspensión de parásitos pre-tratados con suero. Se centrifugaron a 3300xg por 30 minutos a 15°C en una centrífuga de columpio sin freno (Aceleración: 7; Desaceleración: 2). Posteriormente se recolectó la banda 3 que presentaba los tripomastigotes metacíclicos (TM). Después se lavaron con 9 ml de PBS y se centrifugaron a 10000 rpm durante seis minutos a 15°C y la pastilla se suspendió en 1 ml de medio DMEM.

6.4.2 Infección de células Vero

Los TM obtenidos de la purificación por gradiente de percoll suspendidos en el 1ml de medio DMEM se contaron en una dilución 1:100 con PBS. Se retiró el medio de los pozos del portaobjetos y se añadieron los parásitos en una proporción 10 parásitos/célula en 30 µl de DMEM. Se dejó incubar 6 horas a 37°C. Posteriormente se retiró el medio con parásitos no internalizados. La laminilla se lavó dos veces con PBS estéril agitando suavemente durante un minuto. Finalmente se fijaron en metanol dentro de una caja coplin durante seis minutos y se dejaron secar al aire. Se realizaron tres ensayos independientes.

6.4.3 Tinción de células infectadas con DAPI

Una vez que la laminilla estaba completamente seca, después de fijarla con metanol, se colocaron en cada pozo 20 µl de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) 50 nM (Calbiochem, Cat. 268298) en oscuridad durante 20 minutos, y posteriormente se lavó dos veces con agua bidestilada en una caja coplin para retirar el exceso de colorante. Se retiró el exceso de agua, y se colocaron unas gotas de una solución de montaje 1:1 de PBS y Glicerol con 0.0125% de azida de sodio para fijar, e inmediatamente se colocó un cubreobjetos para sellar la laminilla.

6.4.4 Fotografías de células infectadas

Las fotografías fueron tomadas en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con el programa Qcapture Pro 6.0 y el microscopio invertido Olympus IX71 con un filtro azul-cian bajo una longitud de onda entre 350-460 nm para observar la fluorescencia. Se tomaron varios campos para obtener mínimo 150 células por cepa y clona. Para contar el número de células infectadas y el número de parásitos por células se utilizó el programa ImageJ.

6.5 Caracterización antigénica

Se realizaron extractos proteicos totales de epimastigotes por sonicación de las diferentes clonas y las cepas parentales, los cuales se encontraban entre el 4to y 5to día de crecimiento en medio LIT. Se cuantificaron y posteriormente se separaron en geles de poliacrilamida para después transferirlos a una membrana de nitrocelulosa para realizar los western blot correspondientes.

6.5.1 Extracción proteica por sonicación

Parásitos de cada cepa parental y clones de cuatro días de crecimiento con una densidad de 40-60 x10⁶ parásitos/ml fueron colectados por centrifugación a 1000xg por 10 minutos a 4°C. Después se lavaron y centrifugaron dos veces en PBS pH 7.2. La pastilla celular se pesó (peso húmedo) y posteriormente se suspendió en 5 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8.2 por cada gramo de peso húmedo de parásitos y se adicionaron inhibidores de proteasas siguiendo las proporciones indicadas en la Tabla 1. Posteriormente, los parásitos fueron lisados en un sonicador (modelo vibracell Sonic & Materials, USA) cuatro veces por 4 minutos, a 100 watts con intervalos de 1.5 segundos, y al final se homogeneizó con vórtex durante 3 minutos. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10,000xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto proteico total de epimastigotes) fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso (Sánchez *et al.*, 2001).

Tabla 1. Concentraciones de los inhibidores de proteasas

Inhibidor	Concentración stock	Estabilidad	µl agregados a 5ml de buffer	Concentración final
EDTA (Sigma E-9884)	500 mM	Meses a 4°C	125	5 mM
PMSF (Sigma P-7626)	200 mM	9 meses a 4°C	25	1 mM
Leupeptin (Sigma L-2884)	10 mM	1 mes a -20°C	50	0.1 mM
Pepstatin (Sigma P-5318)	1 mM	Meses a -20°C	5	0.001 mM

6.5.2 Cuantificación de proteínas por el método Lowry

Se determinó la concentración proteica de los extractos totales de epimastigotes mediante el método de Lowry, para lo cual se utilizó el kit DC Protein Assay BIO-RAD (Reactivo A Cat 500-0113, Reactivo B Cat 500-0114 y Reactivo S Cat 500-0115), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma A-7030) y se obtuvo

la absorbancia a una densidad óptica de 655 nm en un iMark Microplate Reader (BIO-RAD).

6.5.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se utilizaron los extractos proteicos totales de epimastigotes de las cepas parentales y las clonas. Se utilizaron 10 y 20 µg de cada extracto a los que se les adicionó amortiguador de muestra (Tris-HCl 200 mM, β-mercaptoetanol 2%, SDS 8%, Azul de bromofenol 0.4%, Glicerol 40% y agua bidestilada 28%) y posteriormente se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. Para cada gel se colocaron 2 µl de marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Cat. 26619). Las proteínas se separaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con 75 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes, en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Acrilamida 30% –bisacrilamida 8%, Tris-HCl/SDS pH 8.8, persulfato de amonio al 10%, TEMED y agua bidestilada). La electroforesis se realizó a 150 volts durante aproximadamente 45 minutos, a temperatura ambiente. Para observar el perfil proteico de cada extracto, los geles se tiñeron con Azul Coomasie (Metanol 50%, Ácido acético 10%, Azul de Coomasie R250 Bio-Rad, Cat. 161-0406 al 0.25% y agua bidestilada 40%) durante 20 minutos y posteriormente se dejaron en una solución desteñidora (Metanol 30%, ácido acético 10% y agua bidestilada 60%) toda la noche.

6.5.4 Western blot

Los geles de los extractos proteicos de las cepas parentales y las clonas descritos anteriormente, se realizaron por duplicado y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20 µm) en presencia de amortiguador de transferencia frío (Tris base 0.025M, Glicina 0.2M y Metanol 20%) durante 75 minutos a 100 volts. Concluido el tiempo, se recuperó la membrana y se lavó con PBS. Las

membranas se cortaron en tiras de 4 mm. Se dejaron bloqueando con leche descremada al 10% en PBS durante toda la noche a 4°C en agitación lenta.

Posteriormente, las tiras de nitrocelulosa se incubaron con un pool de sueros de ratones infectados con la respectiva cepa parental con la dilución indicada en la Tabla 2 (en leche descremada al 10% en PBS) y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Se realizaron tres lavados con PBS Tween 20 (Sigma P-1379) a 0.1% en agitación fuerte. Después se incubaron con el anticuerpo secundario en la dilución indicada en la Tabla 2 en PBS-Tween 20 al 0.1%, durante dos horas a temperatura ambiente, en agitación suave. Se realizaron tres lavados como se describió anteriormente. Finalmente, se reveló con el sustrato 3,3-diaminobenzidina (Sigma D-5637) con una concentración de 0.5 mg/ml en PBS 1x y peróxido de hidrógeno (Riedel-de Haën 31642) al 0.02%. La reacción se detuvo con agua destilada.

Tabla 2. Características de los sueros utilizados para los ensayos de western blot.

Anticuerpo primario	Características	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Suero de ratón infectado con la cepa Qro	Pool de sueros obtenidos 18 dpi.	1:25	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma, Cat. A9044)	1:1000
Suero de ratón infectado con la cepa Ninoa	Pool de sueros obtenidos 28 dpi.	1:25	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma, Cat. A9044)	1:1000
mAb F14b	Hibridomas de ratones infectados con la cepa Qro.	10µg	Anti-mouse IgM peroxidase (Santacruz SC-2973)	1:1000
mAb 1D5	Hibridomas de ratones infectados con la cepa Qro.	10µg	Anti-mouse IgG peroxidase (Sigma, Cat. A9044)	1:1000

Se realizaron ensayos de western blot con los anticuerpos monoclonales (mAb) especificados en la Tabla 2. Los western blot se realizaron de la forma indicada

anteriormente con las siguientes modificaciones: Se incubaron 10 µg de cada mAb en leche descremada al 10% y se utilizó el anticuerpo señalado (Tabla 2).

6.6 Expresión de factores de virulencia

Se realizó la extracción de mRNA de TM, posteriormente se trató con DNAsa y se utilizó como templado para ensayos de qRT-PCR para cuantificar la expresión del mensajero del gen T-DAF.

6.6.1 Extracción de RNA

Los TM obtenidos de la purificación con gradiente de percoll en los ensayos de infección, se colectaron a 2500xg por 10 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS estéril a 2500xg por 10 minutos y al pellet final se le agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen 15596-026) y se suspendió por pipeteo. El homogeneizado se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, después se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 segundos. Se dejó incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12.000xg a 4°C por 15 minutos. Se transfirió 350-400 µl de la fase acuosa a un microtubo estéril de 1.5 ml, posteriormente, se le adicionó 0.5 ml de isopropanol y se agitó por inversión para después dejar incubando toda la noche a -20°C. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 12.000xg por 40 minutos a 4°C y se removió el isopropanol. Se realizaron dos lavados con 1 ml de EtOH al 75% en agua DEPC con centrifugación a 7500xg por a 4°C 5 minutos cada uno, se retiró el EtOH y se dejó secar al aire. La pastilla de RNA se suspendió en 23 µl de agua DEPC y posteriormente se tomó una alícuota para cuantificar el RNA en el Nano Drope ND-1000 Spectrophotometer. La integridad del RNA fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-HCl 40 mM, Ácido bórico 45 mM, EDTA pH 8 1 mM). Con base a los valores de la cuantificación del RNA, se realizó

el tratamiento con DNAsa I (Invitrogen Cat. 18068-015) siguiendo las instrucciones del proveedor y se guardaron a -70°C.

6.6.2 Amplificación de mRNA mediante qRT-PCR

El RNA total tratado con DNAsa se utilizó como templado para qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) para la amplificación del gen de T-DAF (*Trypomastigote-decay accelerating factor*) y como gen de referencia GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), para lo cual se utilizaron los iniciadores de la Tabla 3 (diseñados por Arroyo-Olarte *et al.*, 2018). Se utilizó el Kit Universal KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Applied Biosys, Cat. 4309155).

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes T-DAF y GAPDH de *T. cruzi*.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplificado	Temperatura de alineamiento
T-DAF	Fw: CAGTTTGTCTTCTGTCTCGGGG Rv: GTTGTCACCTCCCCATGAAC	141 pb	58°C
GAPDH	Fw: GCATACAGGAGATCGACGC Rv: CGTAAATGGAGCTGCGGTTG	127 pb	59°C

La qPCR se llevó a cabo en el Rotor Gene 6000 (QIAGEN), con las siguientes condiciones: 42°C por 10 minutos (retro transcripción) y 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de: 95°C por 5 segundos, 60°C por 20 segundos, y 72°C por 20 segundos. Además, se realizó una curva de disociación con las siguientes características 59°C a 95°C, 0.2°C/segundo, inmediatamente después del qRT-PCR para confirmar la amplificación de un solo producto. Se realizaron tres ensayos independientes.

Para calcular la expresión relativa del gen de T-DAF, se utilizó la siguiente fórmula (Arroyo-Olarte *et al.*, 2018):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(\text{Eficiencia}_{\text{gen T-DAF}})^{\Delta CT \text{ gen T-DAF}(\text{parental-clona})}}{(\text{Eficiencia}_{\text{gen GAPDH}})^{\Delta CT \text{ gen GAPDH}(\text{parental-clona})}}$$

6.7 Análisis estadístico

Cada parámetro fue evaluado con tres ensayos independientes, por lo que los resultados se muestran con el promedio y su desviación estándar. Los datos obtenidos en la inducción de la metaciclogénesis y en la infección *in vitro* se corrigieron con la fórmula: $\sin^{-1} \sqrt{x}$, debido a que se encontraban expresados en porcentaje. Los datos de la expresión relativa del gen de T-DAF se normalizaron con la fórmula $\log(x + 1)$ (Zar, 2010). Posteriormente fueron analizados en el programa GraphPad Prism 5. Para identificar si existen diferencias estadísticas entre los valores obtenidos entre los triplicados se realizó la prueba de ANOVA (*Analysis of Variance*) de una vía, y como prueba *post-hoc* se realizaron pruebas de Tukey para comparar entre grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Cinética de crecimiento

El crecimiento de las clonas obtenidas a partir de las dos cepas parentales Qro y Ninoa se evaluó mediante una cinética en medio LIT durante 14 días.

La cepa parental Qro (PQ) y sus clonas (Q4, Q6, Q8 y Q11) presentaron el inicio de la fase exponencial a partir del día 2, alcanzando el número máximo de parásitos en diferentes días. La clona Q8 alcanzó su pico máximo de crecimiento al día 9 a diferencia de la cepa PQ y el resto de las clonas que lo alcanzaron al día 7. Respecto a los valores de los picos máximos de crecimiento, Q8 fue la que presentó un valor menor con 50.91×10^6 p/ml a diferencia de Q11, Q6 y Q4 (55.33×10^6 p/ml, 56.75×10^6 p/ml y 57.66×10^6 p/ml respectivamente). Sin embargo, todas las clonas presentaron picos máximos de crecimiento menor a los de la cepa PQ, con 59×10^6 p/ml. Las diferencias en el crecimiento observadas no fueron significativas ($F= 0.01291$, $P= 0.9997$) (Fig. 11).

La cepa parental Ninoa (PN) y sus clonas (N1 y N4) presentaron el inicio de la fase exponencial a partir del segundo día. En este caso, sólo la cepa PN alcanzó el pico máximo de crecimiento en el día 7 y las dos clonas lo alcanzaron en el día 9. Respecto a los valores de dichos picos, N4 fue la que presentó el número más bajo de parásitos con 55.75×10^6 p/ml, a diferencia de N1, con 56.66×10^6 p/ml. De igual forma que en el caso de la cepa Qro y sus clonas, PN fue la que tuvo un mayor número de parásitos (56.16×10^6). Las diferencias observadas no fueron significativas entre éstas ($F=0.02354$, $P=0.9768$) (Fig. 12).

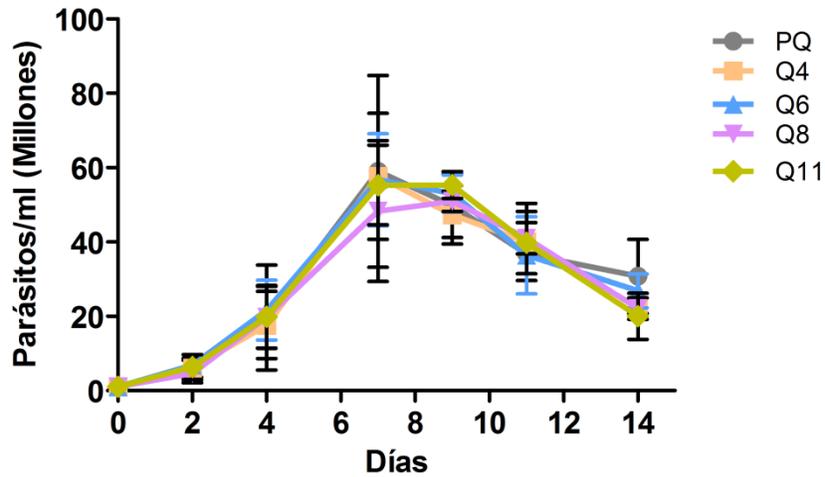


Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa Qro y sus clonas en medio LIT. Se realizó el conteo de los parásitos durante 14 días. Se realizaron tres experimentos independientes, los puntos de las curvas representan los resultados del promedio de los ensayos con su desviación estándar. Las diferencias fueron no significativas con la prueba estadística ANOVA de una vía ($p > 0.05$).

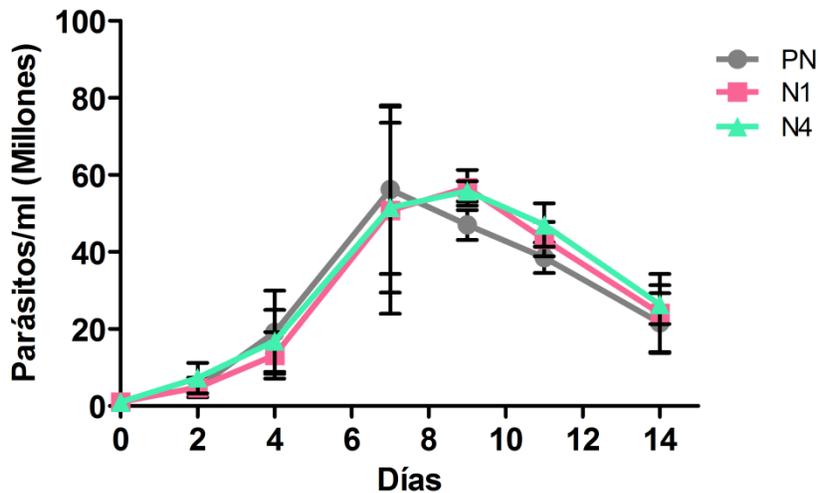


Figura 12. Cinética de crecimiento de la cepa Ninoa y sus clonas en medio LIT. Se realizó el conteo de los parásitos durante 14 días. Se realizaron tres experimentos independientes, los puntos de las curvas representan los resultados del promedio de los ensayos con su desviación estándar. Las diferencias fueron no significativas con la prueba estadística ANOVA de una vía ($p > 0.05$).

7.2 Inducción de metaciclologénesis

La metaciclologénesis es el proceso mediante el cual el epimastigote (fase replicativa) cambia a tripomastigote metacíclico (fase infectiva). Se utilizó el medio GRACE para evaluar la inducción de la metaciclologénesis en las clonas y poder compararla con la cepa parental.

Para corroborar morfológicamente que se indujo la metaciclologénesis, se realizó una preparación antes y después de la incubación en el medio GRACE y posteriormente se tiñó con GIEMSA. Se muestran fotos tomadas en el microscopio óptico VE-BE (Velab) del estadio epimastigote (Fig. 13), los cuales tienen el cuerpo celular ovalado y se observa tanto el núcleo como el cinetoplasto en el centro del cuerpo. De igual forma se tomaron fotografías del estadio tripomastigote metacíclico (Fig. 14), cuyo cuerpo es más alargado y su cinetoplasto se encuentra posicionado en la región subterminal y el núcleo de manera central. De forma representativa se muestran las figuras pertenecientes a la clona Q4.

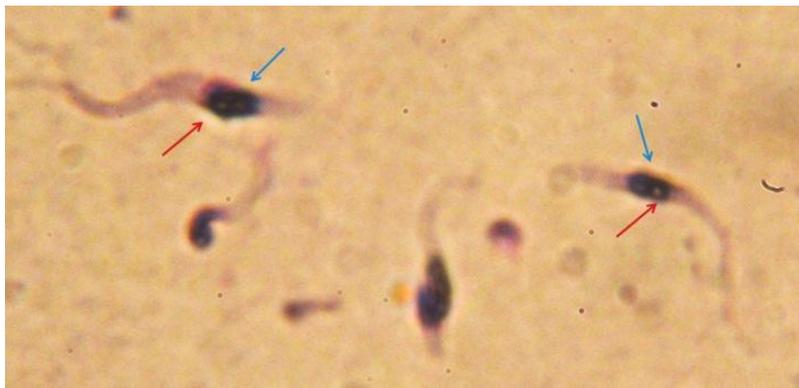


Figura 13. Epimastigotes de la clona Q4. Fotografía de los parásitos antes de ser incubados en medio GRACE. El cinetoplasto (flechas rojas) y el núcleo (flechas azules), ambos se encuentran en la porción central. Tinción con GIMSA. Fotografía tomada por Julián Pineda en el microscopio óptico VEBE, 100x.



Figura 14. Tripomastigotes metacíclicos de la clona Q4. Fotografía de los parásitos después de ser incubados en medio GRACE. El cinetoplasto (flechas rojas) que se encuentra en la región subterminal y el núcleo (flechas azules) que se encuentra en la región central. Tinción con GIEMSA. Fotografía tomada por Julián Pineda en el microscopio óptico VEBE, 100x.

Al cuantificar la metacicloogénesis de la cepa PQ y sus clonas, Q8 fue la que presentó mayor porcentaje de transformación (74.95%), este valor fue mayor al obtenido por PQ (72.11%). Los porcentajes de transformación obtenidos en el resto de las clonas fueron menores al de PQ, ya que Q11 presentó un 67.34%, después Q6 con 64.97% y la de menor porcentaje fue Q4 con 58.14%. Las diferencias observadas no fueron significativas ($F=0.4687$, $P=0.7578$) (Fig. 15a).

Por otra parte, en el caso de la cepa PN y sus clonas, PN fue la que presentó el valor más bajo de metacicloogénesis con un 57.56% de transformación. La clona N1 presentó un porcentaje de 67.02% y N4 un 87.86%. Las diferencias no fueron significativas entre ellas ($F=2.047$, $P=0.2100$) (Fig. 15b).

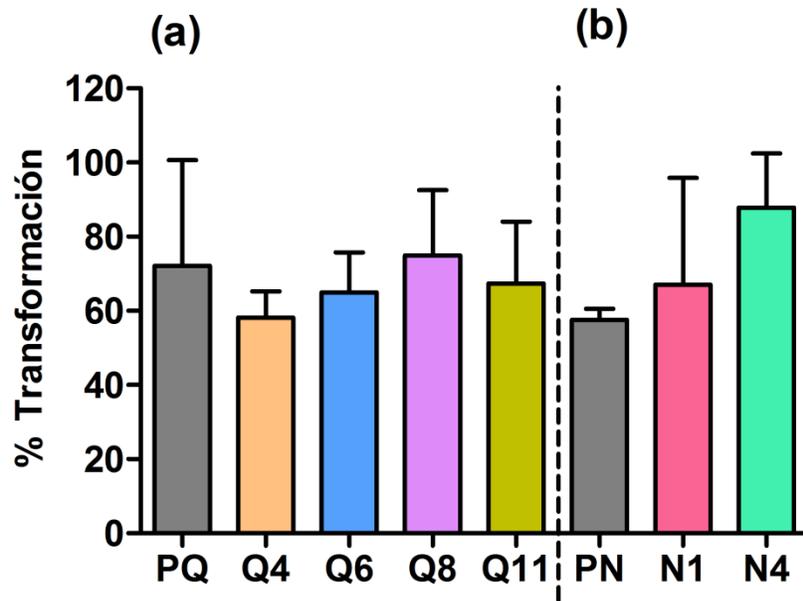


Figura 15. Capacidad metaciclógica de las cepas Qro, Ninoa y sus clones en medio GRACE. a) Cepa Qro y clones. b) Cepa Ninoa y clones. Se realizó la inducción de la metaciclógenesis incubando los parásitos en medio GRACE durante 4 días y posteriormente se evaluó por el ensayo de resistencia al complemento. Se realizaron tres experimentos independientes, las barras representan el promedio de los ensayos con su desviación estándar. Diferencias no significativas con la prueba ANOVA de una vía ($p > 0.05$).

7.3 Infección *in vitro*

Se realizó la cuantificación de la capacidad infectiva de las clones y de las cepas parentales en células Vero, las cuales se incubaron con TM durante 6 horas. Se tomaron fotografías de diferentes campos, la Figura 16 muestra imágenes representativas de cada parental y clona con la que se infectaron las células.

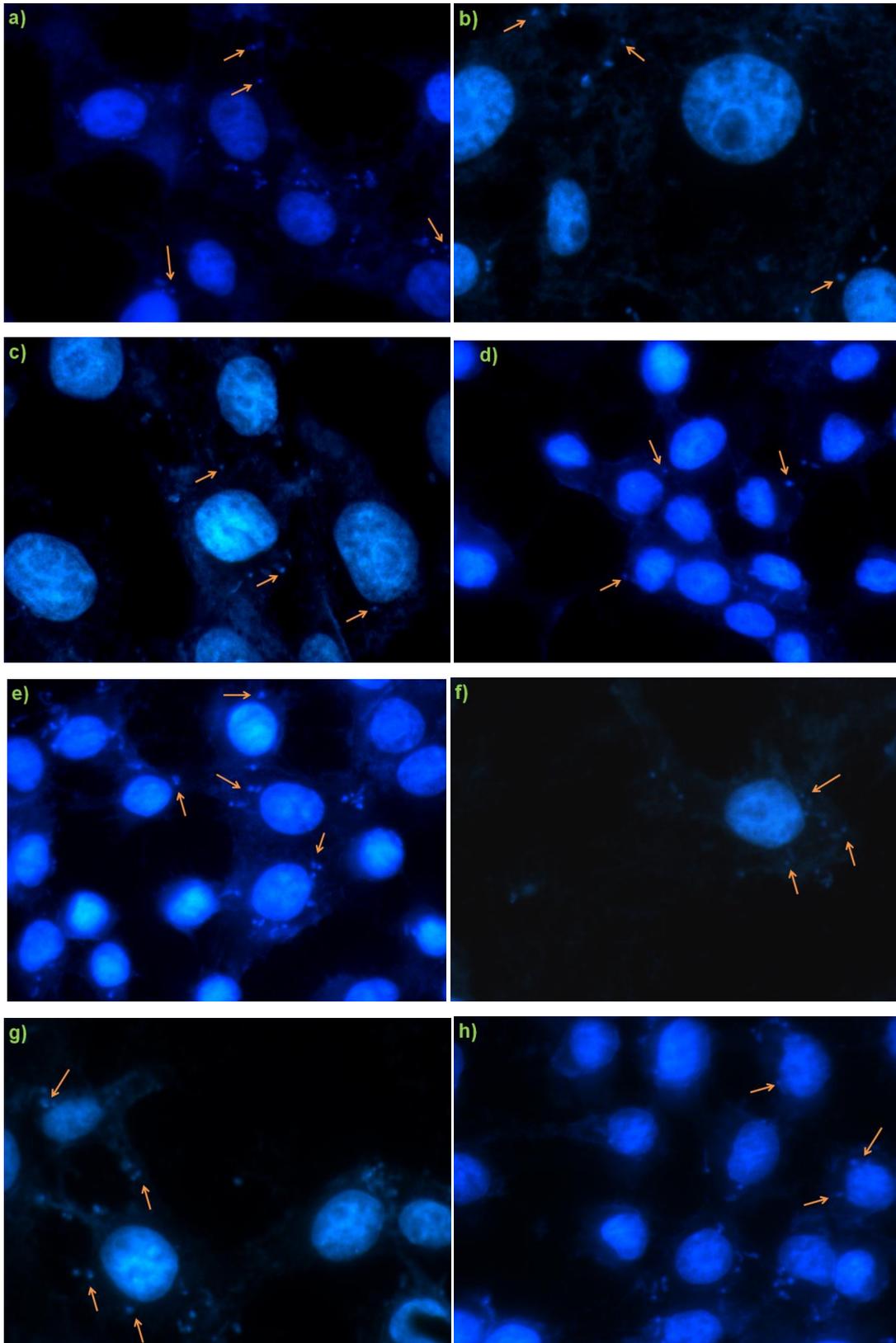


Figura 16. Infección *in vitro* en células Vero por las cepas Qro, Ninoa y sus clones. Las células fueron infectadas con TM con una relación 1:10 célula/parásito durante 6 horas. Se utilizó el microscopio invertido

Olympus IX71 para tomar las fotografías. En la figura se muestran imágenes representativas de tres ensayos independientes de la infección con las parentales y las clonas. a) PQ, b) Q4, c) Q6, d) Q8, e) Q11, f) PN, g) N1 y h) N4. Las flechas naranjas señalan los amastigotes intracelulares, en azul se observa el núcleo de las células y de los amastigotes. 60x.

Se realizó la cuantificación de las células infectadas y los amastigotes dentro de las mismas. Los porcentajes obtenidos para la cepa PQ y sus clonas resultaron similares, la clona con mayor capacidad infectiva fue Q4 con 51.3%, seguida de Q6 con 49.6% de infección, Q11 presentó un 46.6% y Q8 un 42%. PQ fue la que presentó la menor capacidad de infección con 40.4%. Dichas diferencias no fueron significativas ($F=1.016$, $P=0.4444$) (Fig. 17a).

En el caso de la cepa PN y sus clonas, N1 fue la clona con el mayor porcentaje de infección, con 50.9%, seguida de N4 con 48% y de igual forma que en el caso de Qro, la parental PN fue la que presentó la menor capacidad infectiva, con un 40.7%. Dichas diferencias no fueron significativas ($F=3.016$, $P=0.1240$) (Fig. 17b).

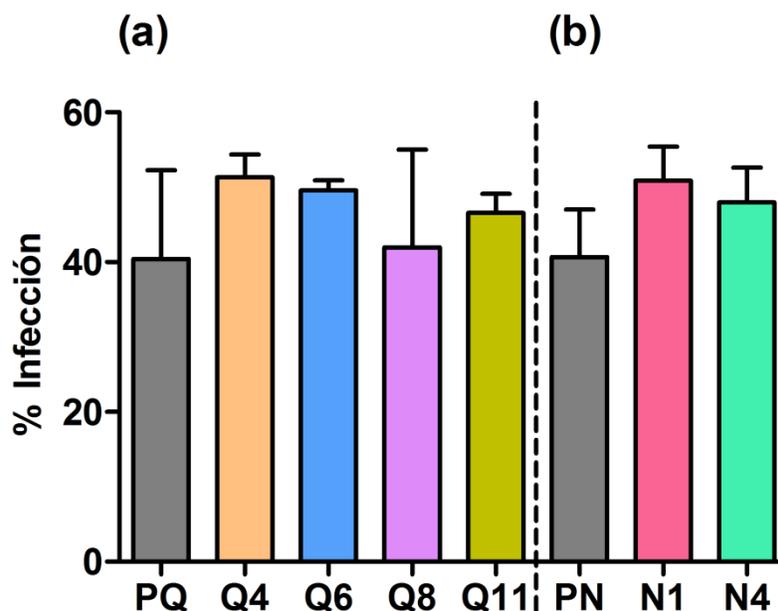


Figura 17. Infección *in vitro* de células Vero por las cepas Qro, Ninoa y sus clonas. a) Cepa Qro y sus clonas. b) Cepa Ninoa y sus clonas. Se indujo la metaciclogénesis, se purificaron los TM y se incubaron durante 6

horas con células Vero (1:10 células/parásitos). Por parental y clona se contaron 150 células. Se realizaron tres experimentos independientes, las barras representan el promedio de los ensayos con su desviación estándar. Diferencias no significativas con la prueba ANOVA de una vía ($p>0.05$).

Además, se cuantificó el número de amastigotes por cada 100 células Vero. En el caso de Qro, la clona Q4 fue la que presentó mayor número de amastigotes internalizados con un promedio de 82.9 parásitos en 100 células, seguido de Q6 con 81.3 parásitos, seguida de Q11 con 76.3 parásitos y Q8 con 70.2 parásitos. Todas las clonas presentaron mayor cantidad de amastigotes que PQ la cual en promedio presenta 57.5. Dichas diferencias no fueron significativas ($F=0.7718$, $P=0.5677$) (Fig. 18a).

En el caso de Ninoa, PN y sus clonas, N1 fue la clona con el mayor número de amastigotes con 93.6 en 100 células en promedio, seguida de N4 con 78.6 y de igual forma que en el caso de Qro, la parental PN fue la que presentó menor número de parásitos, con un promedio de 69.5. Dichas diferencias no fueron significativas ($F=1.317$, $P=0.3356$) (Fig. 18b).

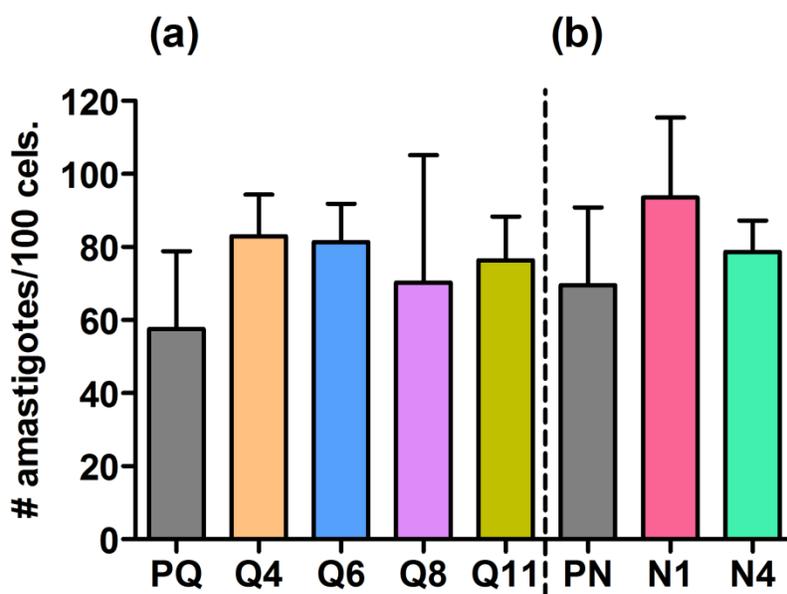


Figura 18. Número de amastigotes por cada 100 células Vero de las cepas Qro, Ninoa y sus clonas. a) Cepa Qro y sus clonas. b) Cepa Ninoa y sus clonas. Se realizaron tres experimentos independientes, las barras

representan el promedio de los ensayos con su desviación estándar. Diferencias no significativas con la prueba ANOVA de una vía ($p>0.05$).

7.4 Perfil proteico

Se observó el perfil proteico de las diferentes clonas y cepas parentales para determinar si la tendencia obtenida en la infección *in vitro* se debían a diferencias en las proteínas expresadas.

Entre PQ y sus clonas se observaron 12 proteínas en común. Las proteínas de mayor peso se localizaron entre los 100 y 90 kDa, de igual forma en todos los extractos se observó una proteína con baja expresión a la altura de 70 kDa. Menores a 55 kDa se observaron proteínas de 53, 50, 48, 45 y 44 kDa. Un doblete de aproximadamente 30 kDa también se observó en todos los extractos y proteínas de 25, 18 y 14 kDa. En Q4, Q6, Q11 y PQ se observó una proteína de aproximadamente 38 kDa que en Q8 está ausente. En Q4 y Q11 se observó una proteína de aproximadamente 36 kDa que es evidente en el resto de las clonas ni en la cepa PQ. En Q4 se observó una proteína única de 35 kDa. De igual forma, las clonas Q4 y Q11 presentaron una proteína más notoria de 25 kDa. (Fig. 19). Estos gels fueron utilizados como control de carga en los experimentos de western blot.

En el caso de PN y sus clonas, se observaron 13 proteínas en común. Las proteínas de mayor peso se encontraron aproximadamente entre los 100 y 90 kDa en un doblete, de igual forma se observó una proteína a la altura de 70 kDa. Menores a 55 kDa se observaron proteínas de 53, 50, 48, 45, 40, 30, 23, 18 y 14 kDa. También se observó una proteína de 69 kDa que es evidente en ambas clonas pero no en la cepa PN. De menor peso, N1 y PN presentaron dos pequeñas bandas de aproximadamente 33 y 22 kDa. (Fig. 19). Estos gels fueron utilizados como control de carga en los experimentos de Western blot.

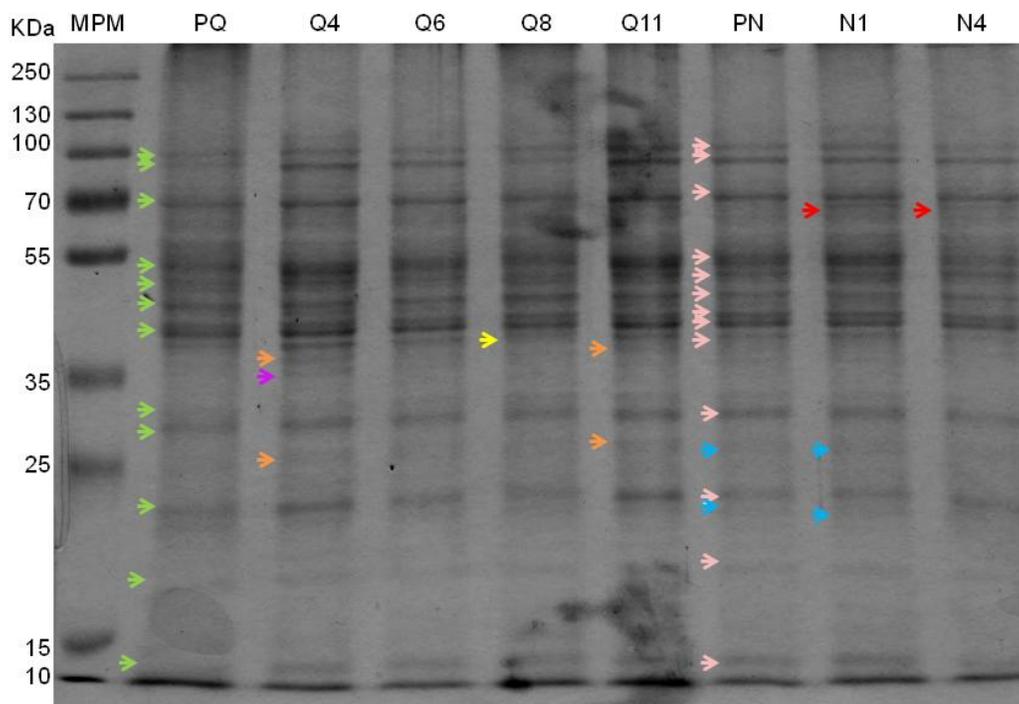


Figura 19. Perfil de proteínas de las cepas Qro y Ninoa y sus respectivas clonas. Las proteínas fueron obtenidas por sonicación, por carril se colocaron 20 µg de cada extracto de proteínas por cepa y clona, en un gel de poliacrilamida al 12%. Las flechas verdes indican las proteínas que se comparten entre PQ y sus clonas; las naranjas indican las proteínas que solo se encontraron en las clonas Q4 y Q11; la morada indica la proteína única de Q4; la amarilla la proteína que está ausente en Q8 y no en el resto de clonas ni la parental; las rosas indican las proteínas que se comparten entre PN y sus clonas; las azules indican la proteína que se expresa en PN y N1; las rojas indican la proteína que comparten las clonas. Gel de proteínas representativo.

7.5 Caracterización antigénica

Con relación al patrón de proteínas observados previamente, se decidió investigar cuáles de ellas podrían ser reconocidas como proteínas antigénicas por anticuerpos anti-*T. cruzi* producidos por ratones infectados con la respectiva cepa parental.

Entre las clonas y PQ se reconocieron 10 antígenos en común, entre los cuales solamente tres (65, 45 y 40 kDa) fueron dominantes, mientras que el resto de los antígenos compartidos entre ellas (250, 115, 84, 70, 60, 40, 30 y 23 kDa) presentaron un reconocimiento variable. Una proteína de 50 kDa fue reconocida solamente en Q4, Q6 y

Q11 y de igual forma un antígeno de 37 kDa. En el caso de proteínas antigénicas de bajo peso molecular, sólo una de 12 kDa fue reconocida en PQ, Q6 y Q8 (Fig. 20).

Al comparar los antígenos reconocidos por el pool de sueros entre PN y sus clonas, se observaron 13 antígenos constantes, entre los cuales solamente uno de 65 kDa y uno de 45 kDa fueron dominantes; el resto de las proteínas reconocidas (240, 130, 100, 60, 37, 30, 23, 15, 13 y 10 kDa) en ambas clonas y PN presentaron diferentes intensidades de reconocimiento. Una proteína antigénica de 30 kDa fue reconocida solamente en PN y N1 (Fig. 20).

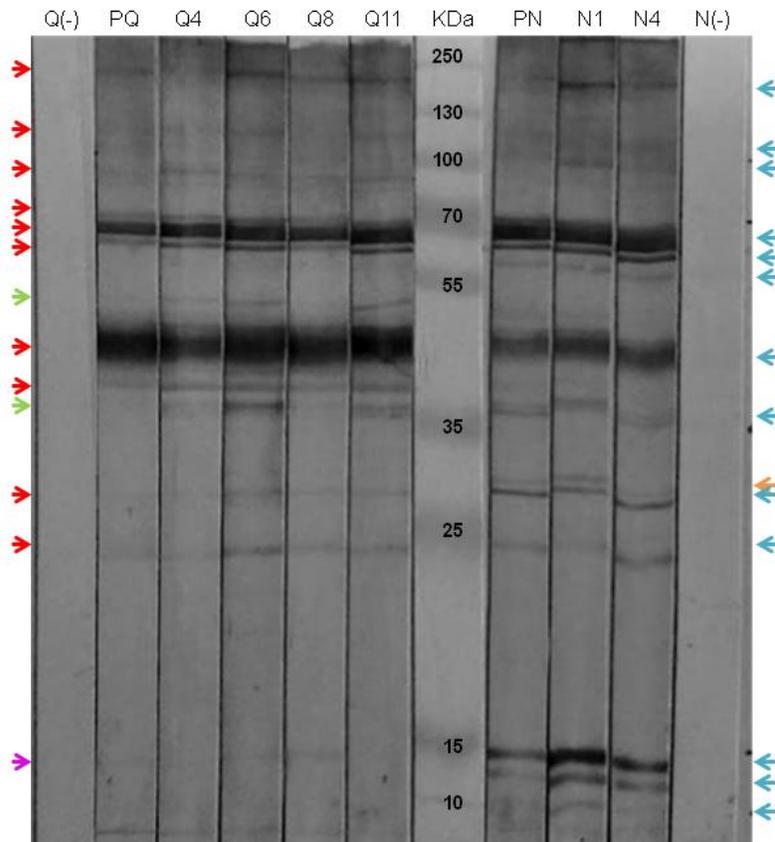


Figura 20. Antígenos reconocidos por pool de sueros de ratones infectados con la cepa parental correspondiente. Geles de poliacrilamida con 20 µg de proteína por carril se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se incubaron con el suero correspondiente a su parental. Las flechas rojas indican los antígenos que se comparten entre PQ y sus clonas; las verdes indican las proteínas que sólo se encontraron en las clonas de Qro; la morada indica la que se comparte entre PQ, Q6 y Q8; las azules indican las proteínas que se comparten entre PN y sus clonas; la rosa indica la proteína que se expresa en PN y N1. A los extremos se presenta el WB con sueros de ratones no infectados como control negativo (Q(-) y N(-)).

Además de los pool de ratones infectados, se probaron dos anticuerpos monoclonales (mAb) que se produjeron previamente en el laboratorio, con la finalidad de comparar si existe un reconocimiento similar entre las clonas y las cepas parentales. De igual forma que el WB anterior se separaron 20µg de extractos proteicos totales de epimastigotes, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se realizaron los ensayos de western blot.

En el caso del mAb F14B (Fig. 21), todas las clonas y las cepas parentales presentaron el reconocimiento de dos antígenos de 29 y 37 kDa. Así como un ligero reconocimiento de dos proteínas de 47 y 60 kDa (flechas rojas). El antígeno de 60 kDa fue reconocido en la parental de Ninoa y N1, y en el caso de Qro sólo se observa en Q4 y Q11. En el caso del mAb 1D5 (Fig. 22), todas las clonas y las cepas parentales presentaron el reconocimiento de un antígeno de 44 kDa.

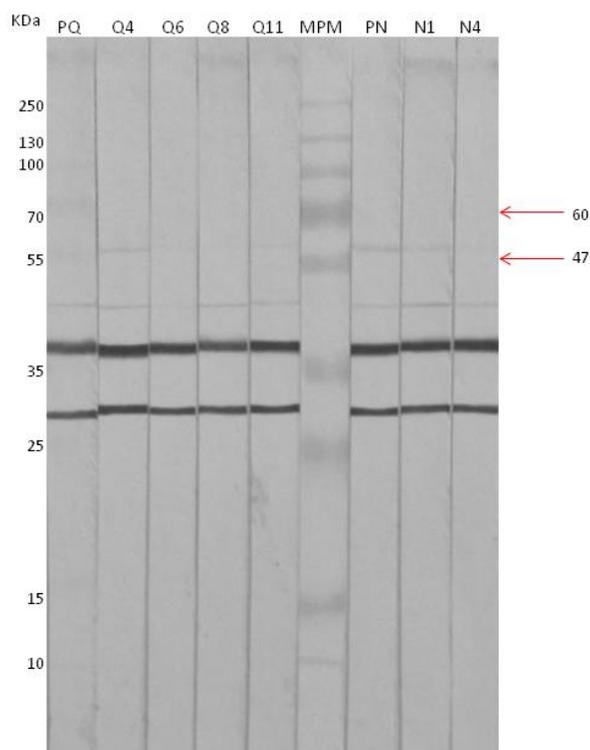


Figura 21. Antígenos reconocidos por el mAb F14B en las clonas y parentales. Geles de poliacrilamida con 20 µg de proteína por carril se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con 10 µg de mAb durante dos horas. Las flechas rojas señalan los dos antígenos inespecíficos reconocidos. Se muestra un WB representativo.

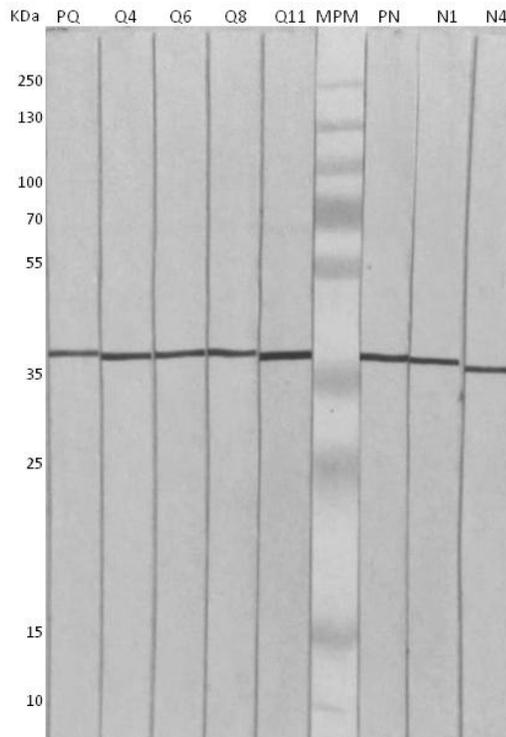


Figura 22. Antígenos reconocidos por el mAb 1D5 en las clonas y parentales. Geles de poliacrilamida con 20 µg de proteína por carril se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con 10 µg de mAb durante dos horas. Se muestra un WB representativo.

7.6 Factores de virulencia

Se realizó el análisis y la cuantificación de la expresión de mRNA de uno de los factores relacionados con la virulencia de *T. cruzi*: *t-daf*, en TM por medio de qRT-PCR.

En el caso de la cepa PQ y sus clonas, tres de las cuatro clonas presentaron una expresión mayor respecto al gen control (*gapdh*) y a PQ, siendo Q4 la que expresó 70% más a *t-daf*, siguiendo Q11 con 42% y Q8 con 28%. A diferencia, Q6 presentó una expresión menor de *t-daf* con 1% menos respecto al gen control y a la parental. Dichas diferencias no fueron significativas ($F= 0.2970$, $P=0.8734$) (Fig. 23a).

En el caso de la cepa Ninoa y sus clonas, N1 presentó 3% mayor expresión del mRNA de *t-daf* respecto al gen control y la cepa parental. Por el contrario, N4 mostró un

76% menos expresión del gen de *t-daf*, siendo estas diferencias no significativas ($F= 1.107$, $P= 0.3899$) (Fig. 23b).

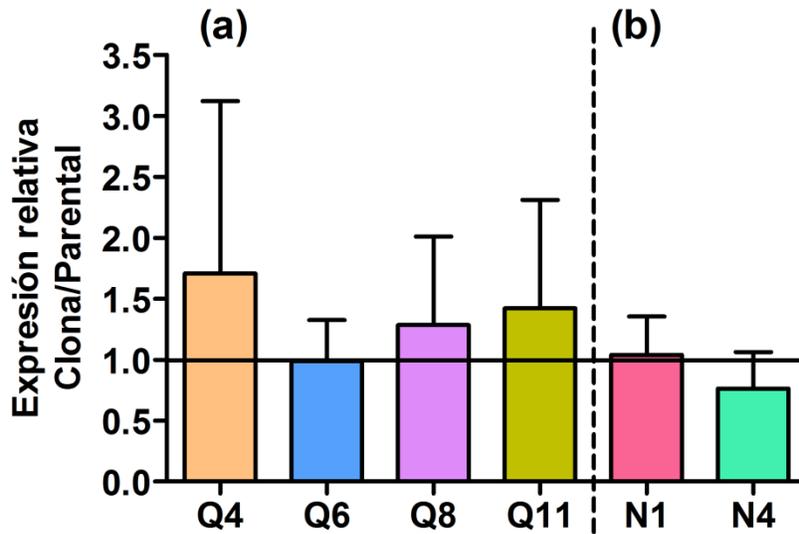


Figura 23. Expresión relativa del mRNA de *t-daf* por las cepas Qro, Ninoa y sus clonas a) Cepa Qro y sus clonas. b) Cepa Ninoa y sus clonas. Los datos fueron normalizados por la cantidad de mRNA de *gapdh* y expresados en relación a la cepa parental como población control. Se realizaron tres experimentos independientes, las barras representan el promedio de los ensayos con su desviación estándar. Las diferencias fueron no significativas con la prueba estadística ANOVA de una vía ($p>0.05$).

8. DISCUSIÓN

T. cruzi es el protozoo parásito causante de la enfermedad de Chagas. Su población está conformada por clonas, que en sentido estricto se definen como células hijas que son genéticamente idénticas a la célula parental (Tybayrenc y Ayala, 2002). Estas clonas constituyen a las cepas del parásito, las cuales pueden presentar una gran variabilidad tanto genética como biológica. En este contexto, las cepas Qro y Ninoa (clasificadas dentro del DTU TcI), han sido caracterizadas ampliamente, demostrándose que existen diferencias biológicas muy marcadas entre ellas (Espinoza *et al*, 2010). Debido a esta heterogeneidad presente entre cepas, se propone la dominancia de algunas de las clonas que las constituyen, siendo éstas las que le confieren las características biológicas a toda la cepa (Tibayrenc y Breniere, 1988). Estudios realizados con clonas han demostrado que diferentes parámetros biológicos pueden ser o no compartidos con la respectiva cepa parental o entre las mismas clonas. Por todo esto, en el presente trabajo se evaluaron diferentes variables biológicas en clonas provenientes de las cepas mexicanas Qro y Ninoa.

Con la finalidad de conocer el comportamiento de las clonas en medio LIT, el cual se ha reportado como uno de los medios más óptimos para el crecimiento del parásito (López-Olmos, 1994), se realizó la cinética de crecimiento de las clonas y las cepas parentales. En nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas al comparar las clonas con su respectiva cepa parental. Estos resultados difieren con los reportados por Engel y colaboradores (1982). Estos autores evaluaron el crecimiento en medio LIT de 19 clonas pertenecientes a dos cepas (Miranda y CA-I) y la cepa Tulahuen como control, donde obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos de clonas de las diferentes cepas. Asimismo, reportan diferencias dentro de los grupos de clonas pertenecientes a una misma cepa.

Otro estudio donde evaluaron el crecimiento fue desarrollado por Dvorak *et al*. (1980), quienes encontraron una relación entre las cinéticas de crecimiento y el tipo de zimodemo al que pertenecen nueve clonas pertenecientes a tres cepas diferentes (WA-250, Esmeraldo, CAN-III) y la cepa Tulahuen como control; en este estudio no se observaron diferencias significativas entre las clonas del zimodemo I (las clonas de la cepa WA-250) ni

con la cepa Tulahuen. Por otra parte si se observaron diferencias entre las clonas pertenecientes al zimodemo II y entre las del zimodemo III (las clonas de la cepa Esmeraldo y CAN-III, respectivamente). Si bien la clasificación de zimodemos no es tan utilizada actualmente, este estudio nos permite observar que las clonas pertenecientes a una misma cepa pueden presentar un comportamiento similar entre ellas, lo cual coincide con los resultados obtenidos con las clonas de las cepas Qro y Ninoa.

Uno de los procesos importantes durante el ciclo de vida de *T. cruzi* es la metacicloogénesis, la cual es el cambio de epimastigote a TM. Este proceso se puede reproducir *in vitro* con el uso de medios de cultivo específicos. En este trabajo se realizó la inducción de la metacicloogénesis con el medio GRACE. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas, sin embargo en las clonas de la cepa Ninoa se observó una tendencia de presentar mayor transformación que la parental. Estos difieren de los reportados por Avendaño *et al.*, (2006), quienes obtuvieron mayor porcentaje de TM por parte de la cepa CT-4 parental (40%) que las tres clonas TC- α , TC- β y TC- π aisladas de la misma (con porcentajes menores a 30%), siendo estas diferencias significativas. Sus resultados a diferencia de los obtenidos con las clonas y cepas Qro y Ninoa (que fueron mayores al 50%), se podrían atribuir al medio de cultivo utilizado para inducir la metacicloogénesis, ya que estos autores utilizaron el medio TAU-P, el cual, de acuerdo con López-Olmos (1994), presenta menores porcentajes de transformación que el medio GRACE.

De igual forma, nuestros resultados obtenidos con las cepas parentales difieren con los reportados previamente por López-Olmos y colaboradores (1998) quienes para la cepa Ninoa obtuvieron un porcentaje de 28% de transformación y los reportados por Bastida-Jaime (2018) quien obtuvo para la cepa Qro un 67.39% de TM. Esto puede atribuirse a las modificaciones de pH que se realizaron al medio GRACE para nuestro trabajo; al cual se le bajó el valor de pH a 1.5 con HCl 1N y posteriormente se subió a un valor de 5.8 con NaOH 1N, las cuales se realizaron con base en los resultados reportados por Jiménez-Ortíz *et al.*, (1987). Estos autores demostraron que la variación del pH de algunos medios de cultivo, entre ellos el medio GRACE, presentaron un efecto mayor sobre la metacicloogénesis. De igual forma se observó este efecto al suplementar los medios con

suero fetal bovino (SFB), motivo por el cual, los valores de metaciclologénesis de nuestras cepas parentales, 72.11% para Qro y 57.56 % para Ninoa, lograron ser más altos a los reportados previamente.

La metaciclologénesis permite obtener la fase infectiva del parásito, por lo cual es posible evaluar la infectividad de las cepas y las clonas en un cultivo celular. En este trabajo se utilizaron células Vero, que se incubaron durante seis horas con tripomastigotes metacíclicos purificados por un gradiente de percoll, método reportado para separar eficientemente las fases del parásito (Caviedes *et al.*, 1994).

Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, pero para ambas cepas, sus respectivas clonas mostraron porcentajes de infección mayores a la parental. En el caso específico de Qro, solo en Q8 se obtuvo un valor cercano (40.4% y 42%, respectivamente), lo cual se vió reflejado en el número de amastigotes, ya que a mayor porcentaje de infección mayor número de parásitos se observaron. Estos resultados difieren de los reportados en otro estudio realizado con clonas, en el cual cuantificaron la infección de células BESM con cuatro clonas de dos cepas diferentes (Miranda y CA-I, dos clonas por cepa). En este caso se observaron diferencias entre las cepas y diferencias entre las dos clonas de la cepa CA-I (siendo CA-I/71 70 veces más infectiva que la clona CA-I/72); de igual forma se presentaron diferencias entre las clonas aisladas de Miranda, siendo estas menores en comparación a las clonas de la otra cepa (Doyle *et al.*, 1984), por lo cual se plantean la posibilidad de que las condiciones de laboratorio estén influyendo en la selección de clonas. Esto último se relaciona con lo reportado por Contreras *et al.*, (1994), quienes compararon la capacidad de infección *in vitro* de la clona Dm30L, la cual fue mantenida en tres condiciones diferentes: en pases de vector y ratón, en pases en ratones recién nacidos y en medio LIT; encontrándose que los parásitos mantenidos en la primera condición (vector/ratón) presentaron más del doble de porcentaje de infección, comprobando así que el mantenimiento de los parásitos en condiciones de laboratorio puede influir en el comportamiento de las cepas o clonas.

Esto a su vez se relaciona con la posibilidad de que estas condiciones estén induciendo cambios en la composición de las poblaciones del parásito o la posibilidad de que se estén seleccionando algunas de las clonas y éstas dominen en el comportamiento de

las cepas. Los resultados obtenidos por Contreras y colaboradores (1994) nos permiten plantear la perspectiva de evaluar a las clonas de las cepas Qro y Ninoa en diferentes condiciones para así conocer si nuestros parásitos están perdiendo su capacidad de infección.

Otro factor importante relacionado con la capacidad infectiva o el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero son las proteínas del parásito, motivo por el cual se decidió realizar un perfil proteico a partir de un extracto total de epimastigotes de las cepas y clonas. En general los extractos entre la cepas y las clonas son muy parecidos, con la presencia de algunas proteínas propias de las clonas. Es sabido que existen proteínas únicas para cada estadio del parásito, entre las conocidas en epimastigotes se encuentra una glicoproteína de 72 kDa (gp72) que se encuentra en la superficie de la membrana celular y el paquete flagelar (Harth *et al.*, 1992), en nuestros extractos se alcanza a ver una proteína de ese peso de muy baja intensidad, en todas las clonas y las parentales, la cual podría tratarse esta gp72. Esto nos da pauta para un futuro estudio utilizando lectinas para aclarar esta posibilidad.

De igual forma otro estudio realizado por Díaz y colaboradores (2011), en el que se compararon extractos proteicos de amastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo pertenecientes a clonas obtenidas de un aislado (TcI) de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica reportó la existencia de proteínas específicas para tripomastigotes y amastigotes. En este estudio por medio de electroforesis de dos dimensiones observaron 33 proteínas específicas para tripomastigotes y 28 para amastigotes. Lo cual nos da pauta a realizar a futuro el análisis y la comparación de proteínas de otros estadios del parásito con las clonas de Qro y Ninoa.

Por otra parte, al comparar nuestros resultados con los reportados para las cepas parentales por Lozano-Hernández (2009), se observan resultados similares. La autora comparó extractos proteicos de las cepas Qro y Ninoa con diferentes métodos de extracción, en el caso de los extractos de epimastigotes obtenidos por sonicación, ella no reporta diferencias entre las cepas, lo cual se puede observar en nuestro perfil proteico, ya que en general (cepas y clonas de ambas) presentan un patrón parecido. Estas similitudes se pueden deber a que Qro y Ninoa pertenecen al mismo DTU, lo cual fue reportado por

Bastida-Jaime (2018), quien observó proteínas únicas para cepas pertenecientes al TcI y únicas para el TcVI, por lo cual sería importante comparar extractos proteicos entre clonas de diferentes DTU's, ya que a pesar de que son muy similares con las parentales, si existen proteínas únicas de las clonas.

Retomando lo reportado por Lozano-Hernández (2009), observó diferencias entre extractos de epimastigotes obtenidos por sonicación y extractos de epimastigotes obtenidos por detergentes caotrópicos, siendo estos últimos los que presentaron un mayor número de proteínas visibles en un gel de poliacrilamida y al comparar los pesos moleculares de las proteínas visualizadas para ambos extractos, hay proteínas presentes en el extracto por sonicación que en el otro extracto (por detergentes) no se encuentran y viceversa. Sería interesante comparar en las clonas, el perfil de proteínas obtenido con los dos procesos de extracción.

Por otra parte, es importante conocer cuáles de las proteínas observadas son reconocidas como antígenos por parte de los anticuerpos generados en ratones infectados con parásitos de la respectiva cepa parental y así definir si son proteínas inmunodominantes, si éstas se expresan en mayores cantidades o si existe alguna que nos permita descartar entre clonas. En la cepa Qro y sus clonas se reconocieron los mismos antígenos entre ellas, sin embargo, las clonas presentaron al menos una proteína diferente a la parental. En el caso de Ninoa, sólo una proteína fue reconocida de forma diferente en la cepa PN y N1, el resto fueron reconocidas igual. Sánchez *et al.*, (2001), utilizando un extracto de la cepa Qro y sueros de pacientes crónicos, reconocieron siete antígenos inmunodominantes presentes en al menos el 50% de los 252 sueros probados, cuyos pesos moleculares son iguales o aproximados a los obtenidos en las clonas de esa cepa. Otro estudio donde se utilizó a la cepa Ninoa para realizar un western blot con propósitos de diagnóstico muestra la presencia de dos antígenos inmunodominantes, resultando que de 43 muestras, el 86% reconoció una proteína de 74 kDa y el 56% una de 40 kDa (Rangel-Flores *et al.*, 2001), coincidiendo el peso aproximado de ésta última con una de las proteínas reconocidas tanto en la cepa parental como en las clonas de Ninoa.

Los extractos de epimastigotes han sido empleados en pruebas serológicas como el western blot y el ELISA con el fin de realizar el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

En este sentido, mediante ensayos de western blot, Lozano-Hernández (2009) comparó los antígenos reconocidos por pacientes chagásicos empleando extractos de epimastigotes y de tripomastigotes de las cepas Qro y Ninoa, encontrando que los extractos de tripomastigotes presentaron mayor número de antígenos reconocidos, lo cual se puede deber a la técnica de extracción de proteínas utilizada, como ya se mencionó anteriormente, pero también a las proteínas que presenta cada estadio, ya que es bien sabido que existen glicoproteínas que únicamente son expresadas en el estadio tripomastigote, las cuales principalmente se relacionan con la capacidad infectiva y su interacción con el sistema inmune del hospedero, por lo cual sería de importancia realizar un perfil proteico y observar el reconocimiento antigénico con extractos de tripomastigotes de las clonas, ya que si bien no se observaron diferencias significativas en la infección, si se observa una tendencia por parte de las clonas a presentar mayor porcentaje de infección que la parental.

El uso de anticuerpos monoclonales (mAb) en *T. cruzi* ha permitido identificar, caracterizar y aislar diversos antígenos presentes en diferentes estadios del parásito. En este trabajo evaluamos los antígenos reconocidos por dos mAb producidos en el laboratorio. En el caso del mAb 1D5, reconoció una proteína de 45 kDa, que coincide con la reportada por López-Olmos (1999), quien además demostró que la proteína que reconoce este mAb se encuentra únicamente en epimastigotes. En el caso de F14B, reconoció dos proteínas principales (27 y 37 kDa), que coinciden con lo reportado por Benítez-García (2014), además se observa el reconocimiento tenue de dos proteínas de 47 y 60 kDa presente en todas las clonas (de Qro y de Ninoa) y en la parental de Ninoa, esto puede deberse al reconocimiento de un epítipo similar presente en éstas proteínas, ya que al ser un anticuerpo monoclonal, presenta una especificidad de reconocimiento.

Por último, se cuantificó por medio de qRT-PCR, la expresión de T-DAF, una glicoproteína que se encuentra relacionada con la inhibición del sistema del complemento. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de T-DAF, sin embargo se observa una tendencia en algunas clonas de presentar una mayor expresión que la cepa parental. De igual forma, si comparamos entre las clonas de ambas cepas, los valores de expresión en las clonas de Qro son más altos que en las clonas de Ninoa.

Un estudio realizado con la clona CL-14 y la cepa CL demostró que la expresión de glicoproteínas de superficie puede variar entre la parental y sus clonas. En ese caso, la clona CL-14 presentó, en comparación a la parental una expresión reducida de la gp82, la cual ha sido relacionada con la infectividad de los tripomastigotes metacíclicos. De igual forma, evaluaron la expresión de gp35/50 y gp90, en las cuales no se observaron diferencias entre la clona y la parental, por lo que se atribuye que la diferencia de expresión de la gp82 influye en las diferencias de infección entre la clona y la parental (Atayde, *et al.*, 2004). Esto nos permite sugerir que la tendencia observada en las clonas de presentar valores mayores de infección que la parental está influenciada por la expresión de una o varias glicoproteínas que en la parental presenta una menor expresión que en las clonas.

Esto ha sido observado con la proteína CRP en clonas y cepas pertenecientes a distintos DTU's; en las que los autores observaron una tendencia de mayor expresión de CRP en cepas que previamente reportaron mayor virulencia en modelo murino y de forma *in vitro*, a diferencia de las cepas que presentaron baja virulencia (Herique *et al.*, 2016).

De igual forma, los niveles de expresión de otras proteínas relacionadas con la inhibición del complemento han sido estudiados. Uno de estos trabajos fue el realizado por Arroyo-Olarte y colaboradores (2018), quienes reportaron la relación de los bajos porcentajes de infección de forma *in vitro* reportados para la cepa Ninoa, con su alta susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento y a su baja expresión de T-DAF, CRIT y CRP en tripomastigotes de cultivo, en comparación con la cepa Qro. Esto concuerda con diferentes estudios que han demostrado que la susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento es dependiente de la cepa estudiada (Krettli *et al.*, 1979; Cestari y Ramírez, 2010). De igual forma, Arroyo-Olarte *et al.*, (2018), encontraron una mayor expresión de TcCRT en Ninoa respecto a Qro, por lo que concluyen la importancia del análisis simultáneo de la expresión de diferentes receptores relacionados con la resistencia y susceptibilidad al complemento.

El conocimiento de las diferentes moléculas relacionadas en la interacción hospedero-parásito ha dado pauta a su estudio y uso en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con el propósito de obtener pruebas serológicas con una mayor sensibilidad y especificidad. Meira y colaboradores (2002) utilizaron una glicoproteína CRP recombinante en una prueba ELISA, en una prueba de hemocultivo y en una prueba de PCR para evaluar

184 muestras de suero provenientes de pacientes chagásicos, de donadores de un banco de sangre y de pacientes infectados con *Leishmania* spp., en las tres pruebas obtuvieron una alta especificidad y sensibilidad, por lo que se pudo discriminar entre los pacientes chagásicos y los no chagásicos, es decir, los infectados con leishmaniasis y los donadores no infectados, esto demostró la importancia de continuar explorando estas moléculas y comprobar si son viables para su uso con diferentes cepas de los seis DTU's.

Finalmente, este trabajo permitió generar la caracterización biológica y antigénica de cinco clonas, proporcionando información detallada de la biología de *T. cruzi* a nivel de clonas, específicamente en cepas mexicanas. De igual forma, este estudio proporcionó la opción, a nuestro grupo, de utilizar las clonas como material biológico, perfectamente caracterizado y uniforme para experimentos que así lo requieran.

9. CONCLUSIONES

- El comportamiento biológico de las clonas y las cepas parentales evaluadas fue muy similar.
- Las clonas no presentaron diferencias en su crecimiento en medio LIT, en ambas cepas.
- La inducción de la metaciclologénesis *in vitro* en medio GRACE no presentó diferencias estadísticamente significativas pero si una tendencia de las clonas a transformarse más que la cepa parental, esta tendencia fue mayor en la cepa Ninoa.
- La capacidad de infectar células Vero por parte de las clonas fue ligeramente mayor en comparación con las cepas parentales aunque no significativas.
- La comparación del perfil proteico y antigénico de las clonas y cepas parentales, permitió reconocer proteínas que no se observaron en la cepa parental.
- Una tendencia de mayor expresión del gen *t-daf* fue observada en la mayoría de las clonas en comparación con las cepas parentales.

10. PERSPECTIVAS

- Utilizar otro método de extracción de proteínas para realizar otros perfiles proteicos.
- Realizar la caracterización antigénica de extractos de tripomastigotes de las clonas y compararlos con la cepa parental.
- Caracterizar con lectinas específicas el perfil de glicoproteínas de cepas y clonas.
- Evaluar los niveles de expresión de otros factores de virulencia como CRP, TcCRT y CRIT.
- Evaluar el comportamiento de las clonas en modelos *in vivo* para conocer si al comparar las clonas de las dos cepas entre ellas, presentan las diferencias mostradas por las parentales.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Altagracia-Martínez, M., J. Kravzov-Jinich, C. Moreno-Bonett, F. López-Naranjo y J. M. Martínez-Nuñez. 2012. Las enfermedades "olvidadas" de América Latina y el Caribe: Un problema de salud pública global. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(1): 33-41.
- Álvarez-Hernández D. A., G. A. Franyuti-Kelly, R. Díaz-López-Silva, A. M. González-Chávez, D. González-Hermosillo-Cornejo y R. Vázquez-López. 2016. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3): 154-164.
- Andrade, S. G. 1999. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1): 185-187.
- Arroyo-Olarte, R. D., I. Martínez, M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic y B. Espinoza. 2018. Complement system contributes to modulate the infectivity of susceptible TcI strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(4): e170332.
- Atayde, V. D., I. Neira, M. Cortez, D. Ferreira, E. Freymüller y N. Yoshida. 2004. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. *International Journal for Parasitology*, 34: 851-860.
- Avendaño, A., O. Calderón-Arguedas, I. Valerio y M. Chinchilla. 2006. Heterogeneidad en la metaciclologénesis *in vitro* de clones derivados de una cepa costarricense de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitología Latinoamericana*, 61(1-2): 12-16.
- Bastida-Jaime, C. 2018. Caracterización de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de reservorios didélfidos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Barnabé, C., S. Brisse y M. Tibayrenc. 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, 120(5): 513-526.
- Benítez-García, J. M. 2014. Uso de anticuerpos monoclonales murinos, para la caracterización de proteínas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Böker C. A. y G. A. Schaub. 1984. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70(4): 459-469.
- Bosseno, M. F., N. Yacsik, F. Vargas y S. F. Brenière. 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from bolivian triatomines following subculture in liquid medium. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(5): 601:607.
- Camandaroba, E., S. T. Torriceli, D. H. Pessina y S. G. Andrade. 2006. *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(3): 209-217.
- Campos, M. C. O., L. L. Leon, M. C. Taylor y J. M. Kelly. 2014. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 193(1): 17-19.
- Campos, R. F., M. S. Gonçalves, E. AG. Dos Reis, M. G. dos Reis y S. G. Andrade. 1999. Comparative analysis by polymerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1): 23-29.

- Carabarin-Lima, A., M. C. González-Vázquez, O. Rodríguez-Morales, L. Baylón-Pacheco, J. L. Rosales-Encina, P. A. Reyes-López y M. Arce-Fonseca. 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*, 127: 126-135.
- Cardoso, M. S., J. L. Reis-Cunha y D. C. Bartholomeu. 2016. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology*, 6(659): 1-16.
- Carroll, M. C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10): 981-986.
- Castellani, O., L. V. Ribeiro y J. Fernandes. 1967. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *The Journal of Protozoology*, 14(3): 447-451.
- Caviedes, F., R. Ovseiovich y J. Rubio. 1994. A simple method to separate metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* from axenic cultures. *Acta Tropica*, 58(2): 175-177.
- Cestari, I. y M. I. Ramírez. 2010. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One*, 5(3): e9721.
- Contreras, V. T., J. M. Salles, N. Thomas, C. M. Morel y S. Goldenberg. 1985. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3): 315-327.
- Contreras, V. T., W. Araque y V. S. Delgado. 1994. *Trypanosoma cruzi*: Metacyclogenesis *in vitro*-I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(2): 253-259.
- Cruz-Reyes, A. y J. M. Pickering-López. 2006. Chagas disease in Mexico: An analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4): 345-354.

- Coura, J. R. 2013. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8): 962-967.
- De Pablos, L. M. y A. Osuna. 2012. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and their role in Infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7): 2258-2264.
- de Souza, W., T. M. Ulisses de Carvalho y E. Santos-Barrias. 2010. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. Pp. 393-432. En: Telleria, J. y M. Tibayrenc (eds.). *American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier, Massachusetts, EE. UU.
- Díaz, M. L., R. Torres y C. I. González. 2011. Expresión diferencial entre estadios de *Trypanosoma cruzi* I en el aislamiento de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica de zona endémica de Santander, Colombia. *Biomédica* 31(4): 503-513.
- dos Santos, K. K. A., E. F. F. Matias, S. R. Tintino, C. E.S. Souza, M. F. B. M. Braga, G. M. M. Guedes, M. Rolón, C. Vega, A. R. de Arias, J. G. M. Costa, I. A. Menezes y H. D. M. Coutinho. 2012. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. *Journal of Medicinal Food*, 15(1): 66-70.
- Doyle, P. S., J. A. Dvorak y J. C. Engel. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *The Journal of Protozoology*, 31(2): 280-283.
- Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública de México*, 41(4): 322-327.
- Dvorak, J. A., 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *Journal of Cellular Biochemistry*, 24(4): 357-371.
- Dvorak, J. A., D. L. Hartman y M. A. Miles. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *The Journal of Protozoology*, 27(4): 472-474.

- Engel, J. C., J. A., Dvorak, E. L. Segura y M. ST. J. Crane. 1982. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. growth kinetics in liquid medium. *The Journal of Protozoology*, 29(4): 555-560.
- Esch, K. J. y C. A. Petersen. 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1): 58-85.
- Espinoza, B., T. Rico, S. Sosa, E. Oaxaca, A. Vizcaino-Castillo, M. L. Caballero y I. Martínez. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TcI strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 1-10.
- Figueiredo, R. C. B. Q., D. S. Rosa y M. J. Soares. 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *Journal of Parasitology*, 86(6): 1213-1218.
- Freitas, J. M., L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V. F. Gonçalves, S. M. R. Teixeira, E. Chiari, A. C. V. Junqueira, O. Fernandes, A. M. Macedo, C. R. Machado y S. D. J. Pena. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2(3): e24
- Gonçalves, C. S., A. Rodrigues-Ávila, W. de Souza, M. C. M. Motta y D. Pereira-Cavalcanti. 2018. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*, 11(1): 1-12.
- González-Tomé, M. I., M. Rivera, I. Camaño, F. Norman, M. Flores-Chávez, L. Rodríguez-Gómez, V. Fumadó, M. García-López Hortelano, R. López-Vélez, L. I. González-Granado, A. García-Burguillo, M. del M. Santos y O. Ávila. 2013. Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8): 535-542.

- Gourbière, S., P. Dorn, F. Tripet y E. Dumonteil. 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity*, 108(3): 190-202.
- Guzmán-Marín, E. del S., J. E. Zavala-Castro, K. Y. Acosta-Viana y M. E. Rosado-Barrera. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*, 10(3): 177-184.
- Harth, G., A. A. Mills, T. Souto-Padrón y W. de Souza. 1992. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72: Immunological analysis and cellular localization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 109(1): 25-36.
- Henrique, P. M., T. Marques, M. V. da Silva, G. A. N. Nascentes, C. F. de Oliveira, V. Rodrigues, C. Gómez-Hernández, K. A. Norris, L. E. Ramírez y W. S. F. Meira. 2016. Correlation between the virulence of *T. cruzi* strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production. *Experimental Parasitology*, 170: 66-72.
- Jiménez-Ortiz, A., F. J. Adroher, J. A. Lupiáñez, S. Castanys, L. M. Ruíz- Pérez, F. Gamarro, M. A. Carreras, R. Benitez-Rodriguez y A. Osuna. 1987. Influencia de las alteraciones de pH en los medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Ibérica de Parasitología*, 47(1): 23-27.
- Joiner, K. A., W. D. Da Silva, M. T. Rimoldi, C. H. Hammer, A. Sher y T. L. Kipnis. 1988. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23): 11327-11335.
- Kessler, R. L., D. F. Gradia, R. dC. Pontello Rampazzo, É. E. Lourenco, N. J. Fidêncio, L. Manhaes, C. M. Probst, A. R. Ávila y S. P. Fragoso. 2013. Stage-regulated GFP expression in *Trypanosoma cruzi*: applications from host-parasite interactions to drug screening. *PLoS ONE*, 8(6): e67441.
- Kollien A. H. y G. A. Schaub. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*, 16(9): 381-387.

- Krettli, A. U., P. Weisz-Carrington, y R. S. Nussenzweig. 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strains differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical & Experimental Immunology*, 37(3): 416-423.
- Lana, M. y E. M. de Meneses-Machado. 2010. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. Pp. 339-363. En: Telleria, J. y M. Tibayrenc (eds.). *American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier, Massachusetts, EE.UU.
- Laurent, J. P., C. Barnabé, V. Quesney, S. Noel y T. Tibayrenc. 1997. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 114(3): 213-218.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. Yeo, N. Acosta, M. W. Gaunt y M. A. Miles. 2011. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10): e1363.
- López-Olmos, M. V. 1994. Caracterización biológica “*in vitro*” de 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Autónoma de México, México.
- López-Olmos, M. V. 1999. Identificación y caracterización de epítomos proteicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- López-Olmos, V., N. Pérez-Nasser, D. Piñero, E. Ortega, R. Hernández y B. Espinoza. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 69(3): 239-254.
- Lozano-Hernández, N. 2009. Identificación de antígenos inmunodominantes en distintas fases de la enfermedad de Chagas, utilizando un extracto de tripomastigotes de

Trypanosoma cruzi. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Machado, C. A. y F. J. Ayala. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13): 7396-7401.
- Marcili, A., L. Lima, M. Jr. Cavazzana, A. C. V. Junqueira, H. H. Veludo, F. M. Da Silva, M. Campaner, F. Paiva, V. L. B. Nunes y M. M. G. Teixeira. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6): 641-655.
- Martins, A. V., A. P. Gomes, E. Gomes de Mendonça, J. Lopes-Rangel Fietto, L. A. Santana, M. G. Almeida-Oliveira, M. Geller, R. de Freitas-Santos, R. Roger-Vitorino y R. Siqueira-Batista. 2012. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1): 45-58.
- Meira, W. S. F., L. M. C. Galvão, E. D. Gontijo, G. L. L. Machado-Coelho, K. A. Norris y E. Chiari. 2002. *Trypanosoma cruzi* recombinant Complement Regulatory Protein: a novel antigen for use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10): 3735-3740.
- Melnikov, V., F. Espinoza-Gomez, O. Newton-Sanchez, I. Delgado-Ensiso, O. A. Montesinos-Lopez, M. V. Dalin, B. Espinoza, I. Martinez, L. A. Sheklakova, O. Dobrovinskaya y L. P. Karpenko. 2013. Integral approach to evaluation of the pathogenic activity of *Trypanosoma cruzi* clones as exemplified by the mexican strain. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156(1): 70-72.
- Messenger, L. A., M. S. Llewellyn, T. Bhattacharyya, O. Franzén, M. D. Lewis, J. D. Ramírez, H. J. Carrasco, B. Andersson y M. A. Miles. 2012. Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4): e1584.

- Moncayo Á. y A. C. Silveira. 2010. Current trends and future prospects for control of Chagas disease. Pp. 55-82. En: Telleria, J. y M. Tibayrenc (eds.). *American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier, Massachusetts, EE. UU.
- Muñoz, C., A. Solari, W. Apt y I. Zulantay. 2013. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 72(1): 5-21.
- Odagiu, S. y J. D. Mayer. 2015. Chagas' disease in Mexico: factors, surveillance, and recommendations. Proceedings of The National Conference On Undergraduate Research. Disponible en: <http://www.ncurproceedings.org/ojs/index.php/NCUR2015/article/view/1423>. Consultado el 25 de mayo de 2018.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2016. Enfermedades infecciosas desatendidas en las Américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados. Organización Panamericana de la Salud, Washington D. C., EE. UU. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31399/9789275318966-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Consultado el 28 de junio de 2018.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2018. Enfermedad de Chagas. Disponible en: https://www.paho.org.hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=407443&lang=es Consultado el 28 de junio de 2018.
- Osorio, L., I. Ríos, B. Gutiérrez y J. González. 2012. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: Who is who? *Microbes and Infection*, 14(15): 1390-1402.
- Pech-Canul, A. C., V. Monteón y R. L. Solís-Oviedo. 2017. A brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 2017: 1-13.
- Pereira-Nunes, M. C., W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina y A. L. Ribeiro. 2013. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9): 767-776.

- Pérez-Molina, J. A., A. Martínez-Pérez, F. F. Norman, B. Monge-Maillo y R. López-Vélez. 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(11): 1347-1356.
- Pérez-Molina, J. A. y I. Molina. 2018. Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 391(10115): 82-94.
- Pinto, A. S., M. de Lana, C. Britto, B. Bastrenta y M. Tibayrenc. 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *International Journal for Parasitology*. 30(7): 843-848.
- Ramírez-Tolosa, G. y A. Ferreira. 2017. *Trypanosoma cruzi* evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: the specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1667.
- Ramsey, J. M., R. Ordoñez, A. Tello-Lopez, J. L. Pohls, V. Sanchez y A.T. Peterson. 2003. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Pp. 85-103. En: Ramsey, J. M., A. Tello-López y J. L. Pohls (eds.). *Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana*. Instituto Nacional de Salud Pública, Morelos, México.
- Rangel-Flores, H., B. Sánchez, J. Mendoza-Duarte, C. Barnabé, F. S. Brenière, C. Ramos y B. Espinoza- 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: Correlation with electrocardiographic alterations. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(6): 887–895.
- Rassi A. Jr., A. Rassi y J. Marcondes de Rezende. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 26(2): 275–291.
- Rassi A. Jr., A. Rassi y A. Marín-Neto. 2010. Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 375(9723): 1388-1402.

- Salazar-Schettino, P. M., I. de Haro-Arteaga y M. Cabrera-Bravo. 2005. Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina*, 65(1): 63-69.
- Sánchez, B., V. Monteón, P. A. Reyes y B. Espinoza. 2001. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. *Archives of Medical Research*, 32(5): 382-388.
- Sánchez-Valdéz, F. J., C. Pérez Breandán, M. P. Zago, C. Labriola, A. Ferreira y M. Á. Basombrío. 2013. *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. *Molecular Immunology*, 53(3): 198-205.
- Schofield, C. J. y C. Galvão. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2-3): 88-100.
- Secretaría de Salud (SSA). 2014. *Prevención y control de la Enfermedad de Chagas. Programa Sectorial de Salud 2013-2018*. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector. México D. F. Disponible en http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlEnfermedadChagas2013_2018.pdf
- Tambourgi, D. V., T. L. Kipnis, W. D. da Silva, K. A. Joiner, A. Sher, S. Heath, B. F. Hall y G. B. Ogden. 1993. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infection and Immunity*, 61(9): 3656-3662.
- Tapia, V., P. Galdames y G. Ramírez. 2012. Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 27(2): 10-19.

- Teixeira, A. R. L., M. M. Hecht, M. C. Guimaro, A. O. Sousa y N. Nitz. 2011. Pathogenesis of Chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3):592-630.
- Tibayrenc, M., y F. J. Ayala. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18(9): 405-410.
- Tibayrenc, M. y S. F. Breniere. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Major clones rather than principal zymodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1): 249-255.
- Toso, A. M., F. U. Vial y N. Galanti. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Médica de Chile*, 139(2): 258-266.
- Tyler, K. M., C. L. Olsen y D. M. Engman. 2003. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Pp. 1-11. En: Tyler, K. M. y M. A. Miles (eds.). *American Trypanosomiasis. World Class Parasites*. Springer, Massachusetts, EE. UU.
- Tyler, K. M. y D. M. Engman. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6): 472-81.
- Westenberger, S. J., C. Barnabé, D. A. Campbell y N. R. Sturm. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171(2): 527-543.
- World Health Organization (WHO). 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponible en: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>. Consultado el 27 de junio de 2018.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Nueva Jersey, EE.UU.
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. S. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc y A. G. Schijman. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7): 1051-1054.

Zingales, B., M. A. Miles, D. A. Campbell, M. Tibayrenc, A. M. Macedo, M. M. G. Teixeira, A. G. Schijman, M. S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C. R. Machado, S. G. Andrade y N. R. Sturm. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2): 240-253.

Zingales, B. 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184: 38-52.