



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Cuantificación de *Trypanosoma cruzi* en sangre y tejidos de  
ratones infectados experimentalmente con aislados de *Meccus  
phyllosomus* (Hemiptera Reduviidae)**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**ELISABETH NAVA LAZARO**



**CDMX 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:            PROFESOR: GUTIÉRREZ RAMOS ABEL**  
**VOCAL:                    PROFESOR: BONILLA ESPINOSA EDUARDO**  
**SECRETARIO:            PROFESOR: CABRERA BRAVO MARGARITA**  
**1er. SUPLENTE:         PROFESOR: CORDERO HERNÁNDEZ JOSE**  
**2° SUPLENTE:            PROFESOR: GUTIÉRREZ AGUILAR MANUEL**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARÁSITOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA**  
**LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS, UNAM.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARGARITA CABRERA BRAVO**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DRA. ANY LAURA FLORES VILLEGAS**

### **SUSTENTANTE:**

**ELISABETH NAVA LAZARO**

## AGRADECIMIENTOS FINANCIEROS

Este trabajo fue realizado en el “**Laboratorio Biología de Parásitos**” de la Facultad de medicina, UNAM con los siguientes apoyos económicos:

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)

- Proyecto: **UNAM, DGAPA/PAPIIT No. IN221121**

Asignación presupuestal de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM, No. de proyecto:

- Proyecto: **FM/DI/001/20, FM/DI/078/20, FM/DI/22/17.**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de “Ayudante de Investigador Nivel III”. con el **CVU: 1016527**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo por el apoyo brindado, por compartir sus conocimientos y ser la directora de esta tesis.

A la Dra. Any Laura Flores Villegas por su tutoría, por el conocimiento transmitido, por sus consejos y revisiones de este trabajo.

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, por su apoyo en la realización de este proyecto y por la beca CONACYT otorgada.

A la Dra. Martha Irene Bucio Torres, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo y poder realizar este trabajo en el laboratorio.

Al Dr. James González por sus enseñanzas en las técnicas empleadas durante esta tesis.

A la Dra. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca por todo el apoyo brindado durante este proyecto y compartirme sus conocimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas y ventanas al mundo de la ciencia.

A la Facultad de Química por todo el conocimiento brindado.

Al laboratorio Biología de parásitos de la Facultad de Medicina, por permitirme ser parte de su excelente equipo de investigación.

Al Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, por permitirme aprender nuevas técnicas dentro de sus instalaciones.

Al Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE, por el apoyo para continuar con los trabajos experimentales.

## AGRADECIMIENTOS

A mi abuelita Cristina Sánchez Rangel por ser mi inspiración de vida, por siempre motivarme a ser valiente y fuerte.

A mi mamá María Celia Lázaro Sánchez, por todo su amor, por siempre confiar en mí y apoyarme a cumplir mis sueños.

A mi papá Félix Jesús Nava Ayala, por su cariño, apoyo y motivación para seguir.

A mi tía Rosalba Lázaro Sánchez, por apoyarnos a mi hermano y a mí, que sin su ayuda esto no sería posible.

A mi hermano Guillermo Nava Lazaro, por ser mi amigo, mi apoyo incondicional y mi motivación para seguir.

A Dazaet Galicia Badillo, por su cariño y motivación constante para nunca dejar de aprender.

A mi abuelo Félix Natalio Nava García, por su cariño brindado.

A mi prima Patricia Nava Zarza y a mi sobrina Sam, por todo el apoyo y amor incondicional.

A mis amigos Vanesa Ángeles, Mayra Wulfrano, Andrea Salazar, Alitzel Vázquez, Erick Pineda, Manuel Trujano, Karina Martínez, Raymundo Chávez, Oswaldo Salgado, Uriel Martínez y Ernesto Hernández por su maravillosa amistad y apoyo durante este camino.

A Edith Hernández Apolinar, por ser mi inspiración y por su valiosa amistad durante la carrera.

A Sergio Campechano por su amistad y cariño incondicional.

A mis amigas de la vida Anna Karen Heredia y Jocelyn Sánchez por seguir acompañándome en todo momento.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido presentados en:

- **Parasitemia and Differential Tissue Tropism in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* Isolates Obtained from *Meccus phyllosoma* in the State of Oaxaca, Mexico.**

Flores-Villegas, A.L.; Jiménez-Cortés, J.G.; González, J.; Moreno-Rodríguez, A.; Pérez-Cabeza de Vaca, R.; Segal-Kischinevzky, C.; Bucio-Torres, M.I.; De Fuentes-Vicente, J.A.; **Nava-Lazaro, E.**; Salazar-Schettino, P.M y Cabrera-Bravo, M. Pathogens 2022, 11, 1141.

[https:// doi.org/10.3390/pathogens11101141](https://doi.org/10.3390/pathogens11101141)

- **Virulence of isolates from *Triatoma phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae), an endemic Mexican Vector of ChagasDisease.**

15th International Congress of Parasitology Copenhagen, Denmark | August 21-26, 2022. WFP - World Federation of Parasitologists.

- **Parasitemia y sobrevivencia en ratones infectados con aislados de *Meccus phyllosomus*.**

Congreso Internacional de Vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) y de *Trypanosoma cruzi*: Panorama actual y expectativas. Campeche, Campeche del 4-6 de Diciembre de 2019.

# Contenido

Abreviaturas	10
Índice de figuras	12
Índice de tablas	15
Resumen	16
1 Introducción	17
2 Antecedentes	20
2.1 Tripanosomiasis Americana	20
2.1.1 Mecanismos de transmisión	22
2.1.2 Cuadro clínico	24
2.1.3 Diagnóstico	26
2.1.4 Tratamiento	28
2.1.5 Tripanosomiasis en el estado de Oaxaca	28
2.2 Trypanosoma cruzi	33
2.2.1 Taxonomía	35
2.2.2 Clasificación taxonómica de Trypanosoma cruzi	35
2.2.3 Morfología	35
2.2.4 Ciclo de vida	38
2.3 Vector	40
2.3.1 Taxonomía	40
2.3.2 Distribución geográfica	41
2.3.3 Biología del vector	42
2.3.4 Meccus phyllosomus	43
2.4 Caracterización del aislado	47
2.4.1 Caracterización biológica	47

2.4.2	Periodo prepatente	47
2.4.3	Parasitemia	47
2.4.4	Tropismo	48
2.4.5	Mortalidad	48
2.4.6	Moleculares	48
2.4.7	Identificación molecular de <i>T. cruzi</i>	48
2.4.9	Mini-exón	49
2.4.10	Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA)	50
3	Justificación	51
4	Preguntas de Investigación	52
5	Hipótesis	53
6	Objetivos	54
6.1	Objetivo General	54
6.2	Objetivos particulares	54
7	Diseño Experimental	55
8	Metodología	56
8.1	Origen de aislados	56
8.2	Modelo animal	57
8.3	Determinación de curva de parasitemia	57
8.4	Determinación de Supervivencia	58
8.5	Extracción de Órganos	59
8.6	Identificación filogenética de <i>T. cruzi</i>	60
8.7	Extracción de ADN	60
8.8	Identificación de unidades discretas de tipificación mediante PCR	58
8.9	Visualización de ADN	60

8.10	Extracción de RNA (técnica TRIzol®)	60
8.11	Cuantificación de ácidos nucleicos	60
8.12	Transcripción Inversa (cDNA)	61
8.13	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	62
8.14	Análisis estadístico	63
9	Resultados	64
9.1	Curvas de Parasitemia	64
9.2	Curvas de sobrevivencia	65
9.3	Identificación filogenética de <i>T. cruzi</i>	66
9.4	Cuantificación de RNA y DNA	67
9.4.1	Calidad y pureza del RNA	67
1.1.1	Calidad y pureza del DNA (cDNA)	71
9.5	Expresión del gen <i>tssa</i> de <i>T. cruzi</i>	75
10	Discusión	78
11	Conclusiones	82
12	Bibliografía	84

## Abreviaturas

<b>µm</b>	Micrómetros
<b>µL</b>	Microlitros
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNk</b>	Ácido Desoxirribonucleico del kinetoplasto
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CCC</b>	Cardiopatía Chagásica Crónica
<b>CICUAL</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
<b>DTU</b>	Unidades Discretas de Tipificación (Discrete Unit Typing)
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ECh</b>	Enfermedad de Chagas
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EF</b>	Electroforesis
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>Fw</b>	Forward
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IR- Miniexón</b>	Región intergénica del miniexón
<b>kb</b>	Kilobases
<b><i>M. phyllosomus</i></b>	<i>Meccus phyllosomus</i>
<b>Mb</b>	Megabases
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
<b>RT-qPCR</b>	Real-time quantitative PCR
<b>Rv</b>	Reverse
<b><i>T. barberi</i></b>	<i>Triatoma barberi</i>
<b><i>T. bolivari</i></b>	<i>Triatoma bolivari</i>
<b><i>T. brucei</i></b>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b><i>T. dimidiata</i></b>	<i>Triatoma dimidiata</i>
<b><i>T. mazzotti</i></b>	<i>Triatoma mazzotti</i>

<b><i>T. pallidipennis</i></b>	<i>Triatoma pallidipennis</i>
<b><i>T. phyllosoma</i></b>	<i>Triatoma phyllosoma</i>
<b><i>T. picturata</i></b>	<i>Triatoma picturata</i>
<b><i>T. rangeli</i></b>	<i>Trypanosoma rangeli</i>
<b><i>TcI</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU I
<b><i>TcII</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU II
<b><i>TcIII</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU III
<b><i>TcIV</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU IV
<b>TSM</b>	Tiempo de sobrevivencia media
<b>TSSA</b>	Antígeno pequeño de la superficie del tripomastigote (Trypomastigote Small Surface Antigen)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WB</b>	Western Blot

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Transmisión vectorial de <i>T. cruzi</i> .	12
<b>Figura 2.</b> Berenice. Primer diagnóstico de la enfermedad de Chagas.	16
<b>Figura 3.</b> Distribución de individuos infectados con <i>T. cruzi</i> . Estimación de la incidencia mundial de la enfermedad de Chagas por flujo migratorio en países no endémicos, de acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud en 2019.	17
<b>Figura 4.</b> Esquema del mecanismo de infección de <i>T. cruzi</i> a través de los triatominos (Vector). Los triatominos que están infectados con el parásito lo liberan en las deyecciones después de realizar la picadura. <i>T. cruzi</i> ingresa por la zona de la lesión, hacia las células aledañas (incluidos los macrófagos). El parásito evade la destrucción en el interior de los macrófagos y cumple su ciclo de replicación rompiendo la célula del hospedero e infectando a otras. (imagen tomada de Revista Digital de Divulgación Científica, 2020)	19
<b>Figura 5.</b> Signo de Romana	21
<b>Figura 6.</b> Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. A) Paciente con miocardiopatía chagásica (radiografía de tórax). B) Paciente con megacolon chagásico.	22
<b>Figura 7.</b> Tipos de viviendas del Istmo de Tehuantepec donde fueron localizados triatominos <i>M. phyllosomus</i> . (Villalobos <i>et al.</i> , 2011).	25
<b>Figura 8.</b> Distribución de los principales vectores en el estado de Oaxaca.	26
<b>Figura 9.</b> Tripomastigote sanguíneo	29
<b>Figura 10.</b> Formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A) Epimastigote en cultivo (tinción de Giemsa). B) Tripomastigote sanguíneo de un paciente en fase aguda. C) Nido de amastigotes en tejido cardíaco de un paciente en fase crónica (tinción hematoxilina y eosina) (Bern <i>et al.</i> , 2019).	32
<b>Figura 11.</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . a) El triatomino se alimenta del huésped y en las deyecciones que contienen tripomastigotes metacíclicos, éstos penetran la piel e infectan células, b) Dentro de las células, los tripomastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes, c) Los amastigotes se multiplican por	

fisión binaria en los tejidos y se transforman en tripomastigotes sanguíneos, d) Los tripomastigotes sanguíneos lisan las células que los contienen y entran en el torrente sanguíneo, e) Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células y transformarse en amastigotes, f) El triatomino se alimenta con la sangre del huésped infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos, g) Los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector, h) Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio y migran hacia el recto del vector, i) En el recto, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se liberan en las deyecciones del triatomino. (Cortesía: Q. F. B Gabriela Peña Callejas).

	35
<b>Figura 12.</b> Ciclo de vida de los triatominos.	39
<b>Figura 13.</b> Ejemplares Macho y Hembra de <i>Meccus phyllosomus</i> .	40
<b>Figura 14.</b> Modelo experimental. Ratón hembra CD-1	53
<b>Figura 15.</b> Cámara Neubauer utilizada para el conteo de tripomastigotes sanguíneos.	54
<b>Figura 16.</b> Órganos extraídos (Esófago, corazón, cerebro y gastrocnemio).	56
<b>Figura 17.</b> Pasos para la extracción de DNA en tejidos.	57
<b>Figura 18.</b> Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.	62
<b>Figura 19.</b> Parasitemia en ratones (n=32) CD-1 infectados con los aislados de Tehuantitla, Vixhana y Guichivere durante 30 días posteriores a la infección.	65
<b>Figura 20.</b> Supervivencia de ratones CD-1 infectados con los aislados Tehuantitla, Guichivere, Vixhana (n=32) y el grupo control (n=16), durante 30 días posterior a la infección.	66
<b>Figura 21.</b> Capa muscular de gastrocnemio con presencia de infiltrado inflamatorio difuso y amastigotes. A y B. Gastrocnemio Tehuantitla. C. Gastrocnemio Vixhana. D. Gastrocnemio Guichivere. Tinción Eosina-hematoxilina.	68
<b>Figura 22.</b> Capa de músculo cardiaco con presencia de infiltrado inflamatorio difuso y amastigotes. A. Corazón Tehuantitla. B. Corazón Vixhana. Tinción Eosina-hematoxilina.	69

**Figura 23.** Amplificación por PCR de la región intergénica del gen mini-exón para los aislados del vector *Meccus phyllosomus*. M: Marcador molecular escalera de 100 pb. T: Aislado de Tehuantitla: V: Aislado de Vixhana: G: Aislado Guichivere. 70

**Figura 24.** Niveles de expresión relativa del gen tssa en diferentes tejidos de ratones infectados con aislados de *T. cruzi* de distintas localidades de Oaxaca. El análisis de RT-qPCR se realizó con RNA total de corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro de ratones sanos (tiempo 0) e infectados (14, 18, 20 y 22 días post infección) con aislados de Tehuantitla (**A**), Vixhana (**B**), o Guichivere (**C**). Los datos obtenidos del transcrito de tssa se normalizaron contra el nivel de expresión del gen  $\beta$ -actina (*Actb*). Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de al menos dos réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas (n= 8). 79

## Índice de tablas

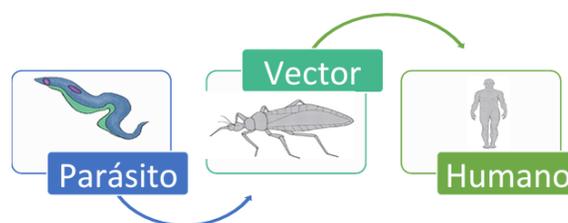
<b>Tabla 1.</b> Manifestaciones clínicas y localización de las Unidades de Tipificación Discretas de <i>T. cruzi</i>	30
<b>Tabla 2.</b> Etapas de desarrollo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	33
<b>Tabla 3.</b> Nombre y Procedencia de los aislados	52
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos para la identificación de <i>T. cruzi</i> .	58
<b>Tabla 5.</b> Clasificación <i>T. cruzi</i> con mini-exón	58
<b>Tabla 6.</b> Reactivos y cantidades para la PCR	58
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de temperatura para PCR Mini-exón	59
<b>Tabla 8.</b> Cantidades empleadas para la reacción de Transcripción inversa.	62
<b>Tabla 9.</b> Parámetros de parasitemia y sobrevivencia en los tres casos aislados de estudio.	67
<b>Tabla 10.</b> Valores de cuantificación de RNA del aislado Tehuantitla	71
<b>Tabla 11.</b> Valores de cuantificación de RNA del aislado Vixhana	72
<b>Tabla 12.</b> Valores de cuantificación de RNA del aislado Guichivere	73
<b>Tabla 13.</b> Valores de cuantificación de RNA del grupo control	74
<b>Tabla 14.</b> Valores de cuantificación de cDNA del aislado Tehuantitla.	75
<b>Tabla 15.</b> Valores de cuantificación de cDNA del aislado Vixhana.	76
<b>Tabla 16.</b> Valores de cuantificación de cDNA del aislado Guichivere.	77
<b>Tabla 17.</b> Valores de cuantificación de cDNA del grupo control.	78

## Resumen

En México, la enfermedad Chagas se notificó por primera vez en la década de 1940 en Oaxaca, actualmente en este estado se han reportado 8 especies de triatomíneos de las 33 que existen en el país. *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas presenta una gran variabilidad genética que resulta en una diversidad de sus características biológicas, bioquímicas, moleculares y antigénicas, así como en una posible relación con las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El estudio del comportamiento de los aislados de *Trypanosoma cruzi* de diferentes zonas geográficas, es importante para determinar la virulencia que presenta cada aislado. Actualmente, se calcula que en el mundo hay entre seis y siete millones de personas infectadas por *T. cruzi*. Si bien algunos estudios han explorado los aislados provenientes de diversas zonas del país, es todavía escasa la investigación que aborda sobre algunos vectores, como lo es el caso de *Meccus phyllosomus*.

Se realizó una comparación de tres aislados provenientes del vector *Meccus phyllosomus* provenientes del estado de Oaxaca en ratones CD-1, se obtuvieron diferencias significativas entre la parasitemia y sobrevivencia de cada aislado, observando que el aislado proveniente de Tehuautitla es el más virulento ya que presentó una parasitemia elevada de  $2.3 \times 10^7$  parásitos/mL y una sobrevivencia del 0% al día 28. Se caracterizaron biológica y molecularmente los aislados, observando que estos pertenecen al linaje TCI y con ayuda de la identificación de la expresión del gen TSSA se pudo concluir que existe mayor expresión en corazón y gastrocnemio que en esófago y cerebro.



**Figura 1.** Transmisión vectorial de *T. cruzi*.

# 1 Introducción

La enfermedad de Chagas es un padecimiento causado por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es considerada la parasitosis más grave en América y una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas (Rojo-Medina *et al.*, 2018). Se encuentra principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde la principal vía de transmisión es de manera vectorial, la cual ocurre cuando los seres humanos u otros mamíferos entran en contacto con deyecciones u orina de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* denominados Triatominos (OMS, 2011)

Se estima que en el mundo existen entre seis y ocho millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* y aproximadamente setenta millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018; OPS, 2020). A poco más de un siglo de su descubrimiento, la enfermedad de Chagas sigue siendo un problema de salud pública. En la actualidad se han reportado casos de enfermedad de Chagas en regiones no endémicas como Canadá, Estados Unidos, Australia, Europa y Japón debido al flujo migratorio (Lidani *et al.*, 2019; Molina *et al.*, 2016).

En México se han reportado 33 especies de triatominos, la mayoría son endémicas del territorio (Villalobos *et al.*, 2011). El género *Meccus*, distribuido en el sur del país, es considerado de gran importancia epidemiológica, ya que se estima que es responsable del 74% de la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* a los seres humanos en México (Díaz *et al.*, 2017a). En 2017, las mayores tasas de incidencia se registraron en Yucatán, Oaxaca e Hidalgo (Rojo-Medina *et al.*, 2018). En el estado de Oaxaca se han reportado ocho especies de triatominos, entre las cuales se encuentra *Meccus phyllosomus*, localizada en la región del istmo de Tehuantepec, donde se han reportado casos autóctonos de cardiomiopatía asociados con *T. cruzi* (Villalobos *et al.*, 2011).

Las cepas más virulentas tienen mayor poder de penetración, sus amastigotes presentan mayor índice de mortalidad de las células infectadas, además cuando

mayor sea el número de parásitos y células muertas, mayor será la cantidad de antígenos parasitarios presentes en el huésped. *T. cruzi* puede invadir cualquier órgano, se ha demostrado que, aunque hay cepas con tropismos bien definidos para células, tejidos u órganos, las de mayor parasitismo son las musculares, cardíacas, macrófagos, fibroblastos, sistema nervioso central y musculares estriadas o lisas.

Las variaciones geográficas en la prevalencia y gravedad de las formas clínicas han sido asociadas con aspectos inmunológicos y genéticos de las diferentes poblaciones humanas y la complejidad genotípica de la población del parásito. Distintas tipificaciones bioquímicas y moleculares realizadas sobre múltiples aislamientos o cepas del parásito han permitido identificar al menos 6 linajes evolutivos dentro de la especie *T. cruzi*, llamados TcI a TcVI. Estos linajes muestran fenotipos muy diferentes en cuanto a infección en el insecto vector, invasión y multiplicación intracelular in vitro, tropismo tisular y virulencia en modelos animales definidos.

Para el diagnóstico de la enfermedad, existen diversos tipos de pruebas, la mayoría de ellas de laboratorio. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda diagnosticar la enfermedad de Chagas con dos pruebas convencionales de laboratorio, y hacer una tercera prueba en caso de discordancia. Dentro de las técnicas convencionales se encuentran los métodos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), IFI (inmuno fluorescencia indirecta) y HAI (hemaglutinación indirecta).

Una de las técnicas de biología molecular para detectar *T. cruzi* es PCR, la cual se caracteriza por su alto nivel de sensibilidad y especificidad, debido a que es capaz de detectar el ADN (ácido desoxirribonucleico) del parásito a partir de pequeñas cantidades (Ferrer, 2015).

Este trabajo de investigación tiene como objetivo aportar conocimiento sobre la virulencia de los aislados obtenidos de la especie *Meccus phyllosomus* en el estado de Oaxaca. Por ello se analizaron tres aislados provenientes de *Meccus phyllosomus*, originarios del istmo de Tehuantepec, para conocer el comportamiento

biológico del aislado mediante la cuantificación de la parasitemia, la sobrevivencia y el tropismo del órgano en el modelo murino.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Tripanosomiasis Americana

La Tripanosomiasis americana, también llamada enfermedad de Chagas, es un (padecimiento crónico, causado por el parásito *Trypanosoma cruzi*, descubierto en 1909 por el médico brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879–1934), quien diagnosticó por primera vez en Minas Gerais, Brasil, a una menor llamada Berenice (Figura 1) (Rassi *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Berenice, primer diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

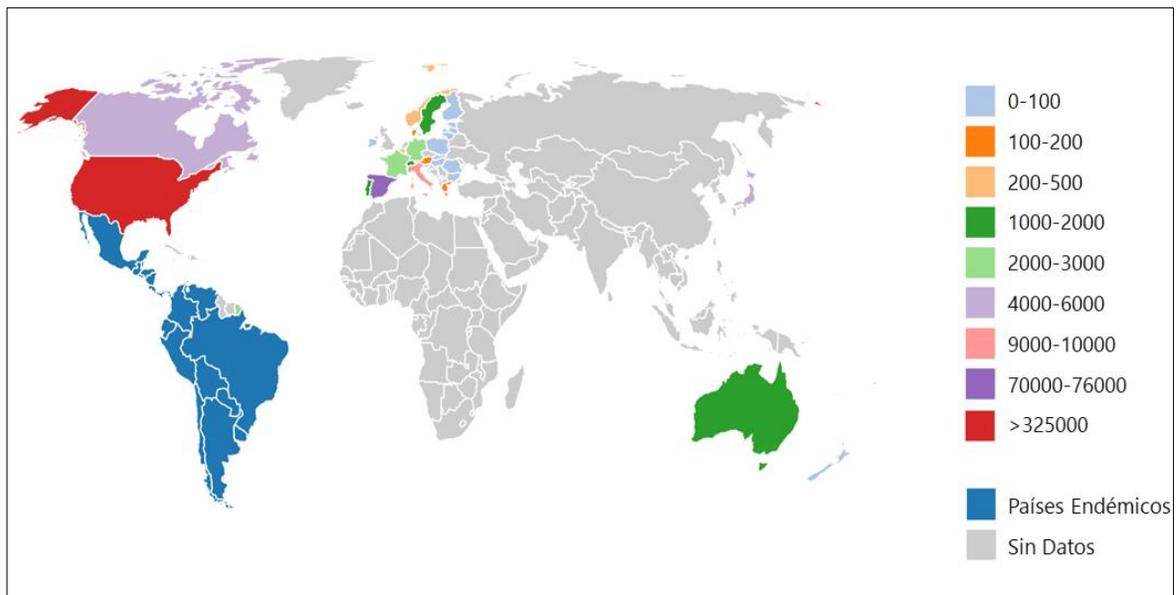
Recuperado de: Lidani *et al.*, 2019.

Considerada una enfermedad tropical desatendida, la enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en áreas endémicas de 21 países de América Latina, de los cuales dos terceras partes son países pertenecientes al Cono Sur (Schmuñis *et al.*, 1977). Se estima que en el mundo hay entre 6 y 8 millones de personas infectadas con *T. cruzi* (Lidani *et al.*, 2019). Este parásito se transmite con mayor frecuencia a los seres humanos y otros mamíferos por medio de insectos

hematófagos de la subfamilia Triatominae, conocidos coloquialmente como chinches (OPS, 2020)

*Trypanosoma cruzi* afecta principalmente a personas que viven en regiones endémicas, aunque debido a la movilidad migratoria, actualmente se ha detectado un mayor número de casos en zonas no endémicas como Canadá, Estados Unidos de América, y diversos países europeos, lo que hace de ella un problema sanitario mundial (Figura 3) (Lidani *et al.*, 2019).

México se encuentra en la lista de países endémicos para la enfermedad de Chagas, en el que dos tercios del territorio mexicano pueden considerarse en riesgo de infección transmitida por vectores. Las condiciones biológicas, el estilo de vida, los factores ambientales y socioculturales son importantes en la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

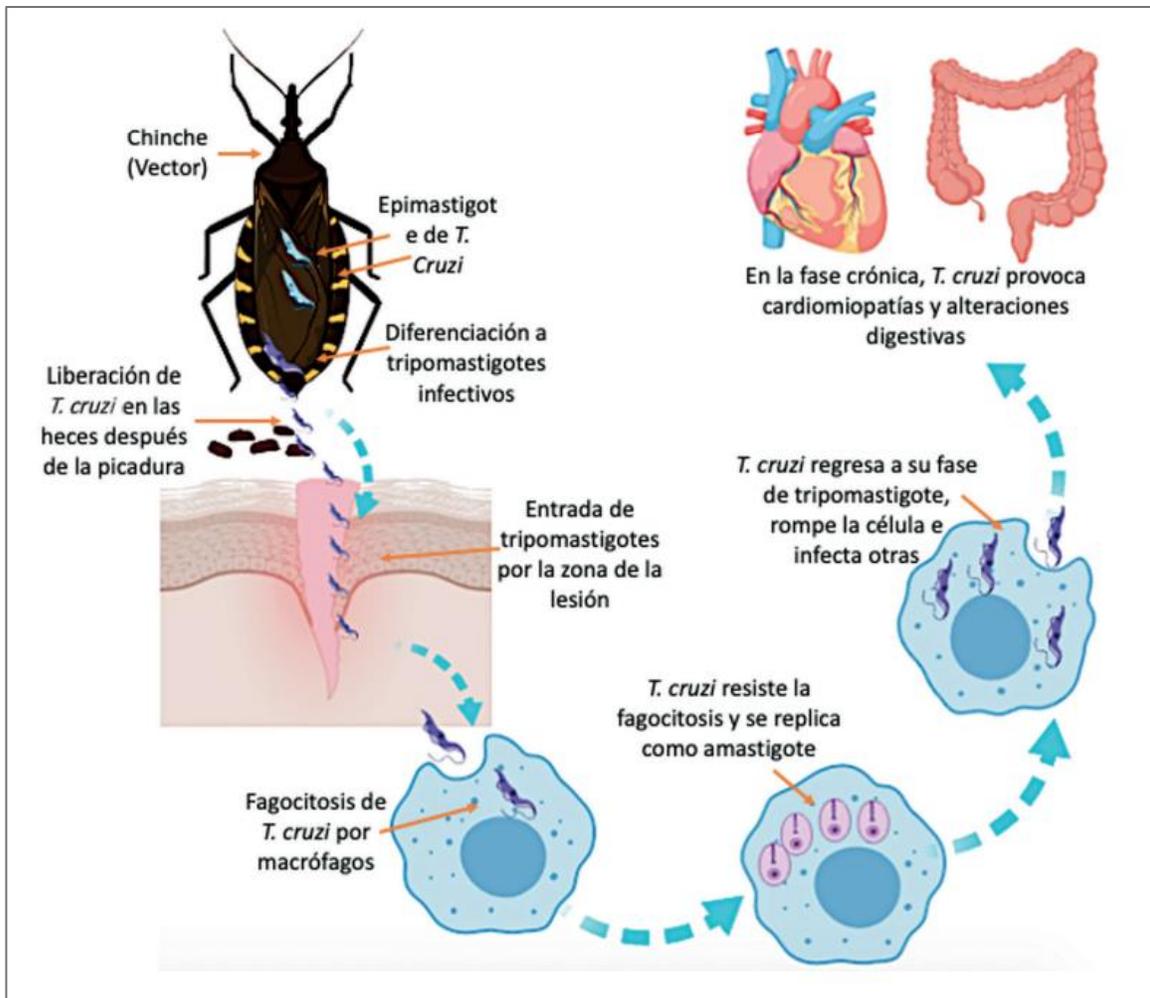


**Figura 3.** Distribución de individuos infectados con *T. cruzi*. Estimación de la incidencia mundial de la enfermedad de Chagas por flujo migratorio en países no endémicos, de acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud en 2019. Modificado de: Lidani *et al.*, 2019.

### 2.1.1 Mecanismos de transmisión

Existen diferentes mecanismos de transmisión en la Tripanosomiasis americana, la vía más común de *T. cruzi* en zonas endémicas es la vectorial, la cual se da por medio de los insectos hematófagos llamados triatominos. Otras maneras de contagio también pueden ocurrir por medio de transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos infectados, vía oral, congénitamente y por accidentes en el laboratorio (OPS, 2018).

La transmisión vectorial ocurre cuando las deyecciones de triatominos infectados con *Trypanosoma cruzi* son depositadas en la piel de los mamíferos, al momento de alimentarse como se observa en la Figura 4 (Cabello *et al.*, 2008). El parásito logra ingresar al torrente sanguíneo cuando el mamífero frota su piel debido al prurito producido. Los insectos triatominos pueden infectar roedores, marsupiales y otros animales mamíferos salvajes. Estos insectos también pueden infectar a los animales domésticos, como perros y gatos, y llevar el parásito dentro de las viviendas humanas (OPS, 2020).



**Figura 4.** Mecanismo de infección de *T. cruzi* a través de los triatominos (Vector). Los triatominos que están infectados con el parásito lo liberan en las deyecciones después de picar e ingerir sangre. *T. cruzi* ingresa por la zona de la lesión, hacia las células aledañas (incluidos los macrófagos). El parásito evade la destrucción en el interior de los macrófagos y cumple su ciclo de replicación, rompiendo la célula del hospedero e infectando a otras. Tomado de:

Revista Digital de Divulgación Científica, 2020 Disponible en:  
[https://www.cibnor.gob.mx/revista-rns/pdfs/vol6num2/2\\_VACUNA.pdf](https://www.cibnor.gob.mx/revista-rns/pdfs/vol6num2/2_VACUNA.pdf).

La transmisión por vía congénita se convirtió en un problema de gran importancia las últimas décadas, tanto en América Latina como en países no endémicos, donde mujeres infectadas con *T. cruzi* transmiten el parásito durante el embarazo, ya sea que estén cursando la etapa aguda o crónica de la enfermedad (Brutus *et al.*, 2010).

La transmisión oral ha llamado la atención en países latinoamericanos, ésta suele ser responsable de brotes de infección aguda en áreas desprovistas de insectos vectores, asociados a la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con el parásito (Shikanai-Yasuda, 2012).

La transmisión por transfusión sanguínea es considerada la segunda vía más importante para la transmisión de *T. cruzi*, después de la vectorial (Monteón *et al.*, 2005). Actualmente, una estrategia para la prevención de la infección por esta vía, es la realización de pruebas serológicas en donadores de bancos de sangre.

### 2.1.2 Cuadro clínico

La Tripanosomiasis Americana ocurre en dos fases: aguda y crónica, siendo esta última dividida en fase crónica asintomática o indeterminada y fase crónica sintomática (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). Ambas fases pueden presentarse de manera asintomática o ser mortales (Mordini *et al.*, 2016).

La fase aguda ocurre generalmente en personas jóvenes, se caracteriza por una parasitemia alta y la mayoría de los casos son asintomáticos. Se presenta en esta fase, una tasa de mortalidad del 5 al 10%, debido a encefalomielitis o insuficiencia cardíaca grave (Bestetti *et al.*, 1987). Los pacientes sintomáticos en la fase aguda presentan: fiebre, la cual puede tener un periodo de dos a cuatro semanas, anorexia, mialgias y cefalea.

Cuando el parásito ingresa transcutáneamente, puede desarrollarse una reacción inflamatoria conocido como chagoma de inoculación (Tanowitz *et al.*, 1992), las cuales, son lesiones cutáneas, ocurridas con mayor frecuencia en el rostro y extremidades del cuerpo, ya que son zonas de mayor exposición a los triatominos.

Cuando el chagoma de inoculación ocurre en la región ocular, es llamado signo de Romaña (Figura 5), presentando edema bipalpebral, el cual tiene la característica de ser unilateral, de coloración rojo-violácea e indoloro. Los chagomas de inoculación tienen una duración variable que puede llegar hasta 15 días (Werner Apt Baruch *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Signo de Romaña.

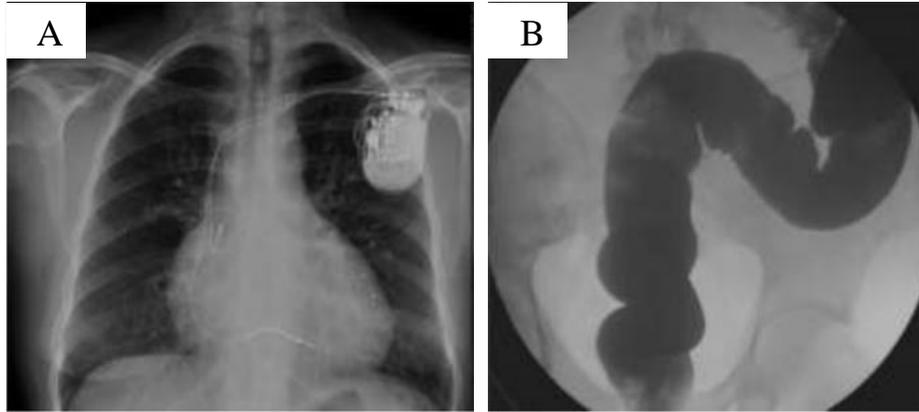
(Tomada de: <https://fmed.uba.ar/sites/default/files/2018-02/2t26.pdf>)

Durante la fase crónica, aproximadamente el 70% de los casos no desarrollan daño en órganos blanco y persisten asintomáticos el resto de la vida (Mario *et al.*, 2014). La fase crónica indeterminada o asintomática, se caracteriza por presentar una parasitemia baja, es clínicamente silenciosa y presenta una duración entre 5, 10 y hasta 20 años (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

Durante la fase crónica sintomática, aproximadamente 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos, hasta un 10% presentan alteraciones digestivas y menos del 5% de manera neurológica (Gascón *et al.*, 2008).

Dentro de los padecimientos asociados a la fase sintomática, se encuentran complicaciones cardíacas como: cardiomegalia (agrandamiento de corazón), insuficiencia cardíaca, alteración de la frecuencia cardíaca y paro cardíaco (muerte súbita), siendo estas las principales causas de muerte en los pacientes, debido a la destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones (Schmuñis *et al.*, 1977). Otras complicaciones en esta fase son las intestinales, como lo son megaesófago (agrandamiento de esófago) y megacolon (agrandamiento de colon), las cuales

causan dificultad para comer o defecar (Figura 6) (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2019).



**Figura 6.** Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. A) Paciente con miocardiopatía chagásica (radiografía de tórax) localizada en la región posteroinferior y apical del ventrículo izquierdo. B) Paciente con megacolon chagásico (enema opaco). Tomada de: (Molina *et al.*, 2016).

Existe un padecimiento que es considerado la principal causa de muerte en los pacientes que se encuentran en la fase crónica, llamada cardiopatía chagásica crónica (CCC), algunos la desarrollan de manera acelerada, lo cual trae como consecuencia una muerte a corto plazo (Cassab *et al.*, 1999; Werner Apt Baruch *et al.*, 2011).

### 2.1.3 Diagnóstico

La aplicación de procedimientos diagnósticos dependerá de los objetivos clínicos, epidemiológicos, recursos financieros, infraestructura de áreas físicas y de equipos, materiales y reactivos de laboratorio, así como del perfil profesional del personal de los servicios de salud responsable de estas acciones.

Los métodos de diagnóstico para *T. cruzi* pueden incluirse en tres grupos principales: parasitológicos, serológicos y moleculares.

El diagnóstico para la detección de la Tripanosomiasis americana depende de la fase de la enfermedad en la cual se encuentre el paciente, el cual se basa en los signos y síntomas clínicos, los datos epidemiológicos los resultados de laboratorio de pruebas parasitológicas, inmunológicas y moleculares.

La visualización del agente infeccioso es la prueba confirmatoria irrefutable en cualquier enfermedad infecciosa, en el caso de la enfermedad de Chagas, esto suele ocurrir en la fase aguda de la enfermedad y en la reactivación. El diagnóstico de laboratorio se basa en la visualización de *T. cruzi* ya sea en un análisis de sangre.

En la fase crónica de la enfermedad la parasitemia disminuye drásticamente, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG específicos, se considera a un individuo infectado, si el suero del paciente muestra resultados positivos al menos en dos técnicas serológicas diferentes.

Para el diagnóstico de la enfermedad en la fase crónica, donde la parasitemia es muy baja o indetectable, se emplean los métodos inmunológicos que consisten principalmente en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Las técnicas más utilizadas en la actualidad son el Ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Voller *et al.* 1975), la Hemaglutinación indirecta (HAI) (Camargo *et al.* 1971), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Camargo 1996) y el Western blot.

Como otra herramienta en el diagnóstico de la infección con *T. cruzi* se ha propuesto el uso de la técnica de PCR. Para ello se toma sangre de pacientes, de la cual se extrae ADN total y se realiza PCR con iniciadores específicos para amplificar una región del ADN de *T. cruzi*. Este método sirve como indicador de la presencia de parásito en la sangre y puede usarse también en tejidos infectados. Los genes más utilizados para este análisis son la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto, secuencias repetidas en el ADN satélite o genes del ARN ribosomal. Esta técnica ha resultado de gran utilidad en la fase aguda de la enfermedad o durante la reactivación de la fase crónica, debido a que presenta una sensibilidad mayor que las técnicas parasitológicas clásicas (Molina *et al.*, 2016).

Actualmente la técnica de PCR se utiliza en actividades de investigación y sólo en algunos hospitales por las limitaciones de infraestructura (de Oliveira *et al.*, 2019).

#### 2.1.4 Tratamiento

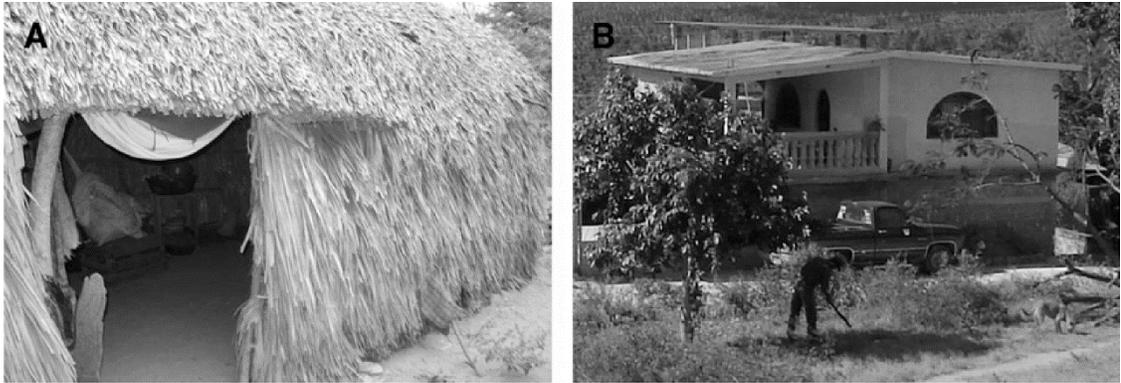
Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se dispone principalmente de dos medicamentos: benznidazol y nifurtimox, descubiertos en 1965 y 1971 respectivamente. Estos medicamentos presentan una efectividad del 50% al 70% durante la etapa aguda de la enfermedad, llegando a un 95% en casos de transmisión congénita con detección temprana.

En los casos de etapa crónica se presenta una efectividad de solo 8 al 30 %. Los pacientes con tratamiento en esta etapa experimentan efectos adversos, entre los que se encuentran las manifestaciones digestivas, que comprenden principalmente pérdida de peso, náuseas, vómito y malestar gástrico (González García *et al.*, 2017).

#### 2.1.5 Tripanosomiasis en el estado de Oaxaca

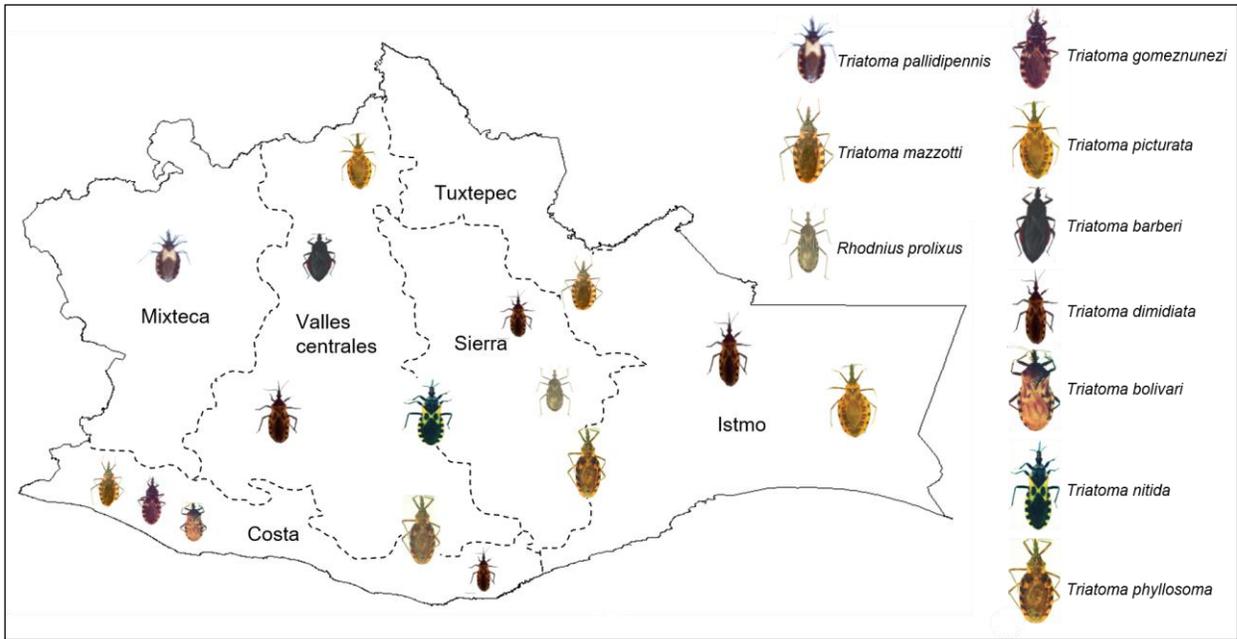
Oaxaca es considerado un estado de gran importancia epidemiológica para la Tripanosomiasis americana por el reporte de casos y la variedad de transmisores (Figura 8), ya que se tienen reportadas al menos once especies diferentes de transmisores (López-Ordoñez *et al.*, 2009).

La enfermedad de Chagas fue notificada por primera vez en México a mediados de 1940 en la localidad de Teojomulco, Oaxaca. En este estado se reporta por primera vez al vector infectado, los reservorios, casos humanos agudos y los primeros casos crónicos de miocardiopatía, megaesófago y megacolon (Martínez-Ibarra *et al.*, 2017b). En 1944, Mazzottii describió un perro infectado con *T. cruzi* en este estado (Cortés *et al.*, 1985). Entre 1939 a 1942 existía el registro de cuatro especies principales de transmisores: *Triatoma barberi*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma mazzottii* y *Rhodnius prolixus*, en 1949 Mazzotti y Dias reportaron la infección de *Triatoma dimidiata* (López-Ordoñez *et al.*, 2009).



**Figura 7.** Tipos de viviendas del Istmo de Tehuantepec donde fueron localizados triatominos *M. phyllosomus*. (Villalobos *et al.*, 2011).

Una región importante en este estado es el Istmo de Tehuantepec, en el cual se han presentado casos de miocardiopatía, megaesófago y megacolon asociados con *T. cruzi* (Salazar-Schettino *et al.*, 2010). En esta región existe la presencia de cuatro especies de triatominos: *T. dimidiata*, *M. mazzottii*, *M. picturata* y *M. phyllosomus*, de las cuales, *M. phyllosomus* sólo se ha reportado en este estado, siendo uno de los vectores más importantes en la transmisión de la enfermedad de Chagas en la parte sur del estado, debido a la cercanía con la población humana (Figura 7) (Zarate *et al.*, 1985).



**Figura 8.** Distribución de los principales vectores en el estado de Oaxaca.  
 Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, FacMed, UNAM.

En la década de 1960-1970 se detectaron serológicamente infecciones por *T. cruzi* en habitantes de Oaxaca. En 1965 se identificaron dos casos por Biagi y Arce; en 1971 se notificaron 47 casos por Goldsmith y colaboradores y en 1978 se estudió un solo caso por Marcuschamer y Reyes (Secretaría de Salud, 2019) (Goldsmith *et al.*, 1978).

En 1961, se comunicaron seis casos con antecedentes de la enfermedad y miocarditis comprobada por necropsia, pero sin confirmación parasitológica y serológica (Secretaría de Salud, 2019).

En 1987, se estudió en Miahuatlán Oaxaca, 85 pacientes con una historia clínica sugestiva de la enfermedad, 14 presuntos casos agudos y 71 casos crónicos, de éstos fueron confirmados 4 casos agudos y 8 casos crónicos, uno de ellos, el primer caso notificado en México de enfermedad de Chagas con mega-sigmoide. También fueron estudiados 14 sueros de donantes cuya positividad fue del 78%, y en 52

escolares de 6 a 14 años, el 88% fue positivo. La captura entomológica fue de 50 triatominos de la especie *Triatoma barberi* y 7 de *T. gerstaeckeri* (Secretaría de Salud, 2019).

En 1979, Goldsmith *et al.*, llevaron a cabo un estudio en 60 comunidades de Oaxaca (Municipios de Jamiltepec, Juquila, Pochutla, Putla y Sola de Vega), examinándose 4023 habitantes de esta zona, la tasa media de prevalencia de la infección fue del 16.3%, y en pacientes de 20 años o más fue de 35.4% (Goldsmith *et al.*, 1978).

En 1984, Salazar-Schettino, investigaron el caso de una paciente del sexo femenino de 26 años, residente de San Pedro Ixtlahuaca, Oaxaca, quién reconocía al vector *T. barberi*, presentaba cuadros febriles repetitivos, además de acalasia en el esófago, lo cual trae dilatación de éste órgano, conocido como “mega-esófago” y con resultado serológico positivo a *T. cruzi* (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

En mayo de 1982, en el Hospital Universitario de Puebla, ingresó un paciente masculino de 59 años, que era originario de Putla.Oaxaca, presentaba cuadro clínico de miocardiopatía Chagásica y de paludismo que fueron confirmados por serología y aislamiento de *T. cruzi* mediante xenodiagnóstico, hemocultivo y frotis sanguíneo, además necesito de un marcapaso de forma definitiva, con ello se inició un estudio en esta comunidad (Cortés *et al.*, 1985).

En la localidad de Santiago Yosotiche, municipio de Putla Oaxaca, se estudiaron 308 individuos, encontrando 79 pacientes seropositivos (25%), con una relación de 1:1 de la infección por *T. cruzi* en ambos sexos, lo cual sugirió que la infección ocurría dentro de la vivienda, muchos referían la presencia de triatominos en todos sus estados y haber sido picados en varias ocasiones. Principalmente el porcentaje de pacientes seropositivos, correspondía a personas mayores de 20 años y el 27% de estos presentaba alteraciones electrocardiográficas como el bloqueo derecho de la rama del haz de His (Cortés *et al.*, 1985).

En este estado la presencia del vector *T. mazzotti* fué reportada por Tay en 1969 bajo condiciones domésticas o intradomiciliadas únicamente, en 1989 Rojas *et al.*, describió en la la localidad de “La Humedad” (Oaxaca) un foco silvestre para la

enfermedad de Chagas, es decir, la presencia de ninfas y adultos de *Triatoma mazzotti* infectados con *T. cruzi*, asociados a cuevas donde habitaban murciélagos y mamíferos (Murcia et al., 2013) (Tay et al., 1981).

Anterior al estudio de Tay et al., 1986, se habían reportado 11 casos clínicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, los cuales incluían dos de los tres casos clínicos reportados en México, el primero detectado en 1965 por Biagi y Arce en Tututepec y el otro por Salazar-Schettino y colaboradores en San Juan Colorado (María et al., 1940).

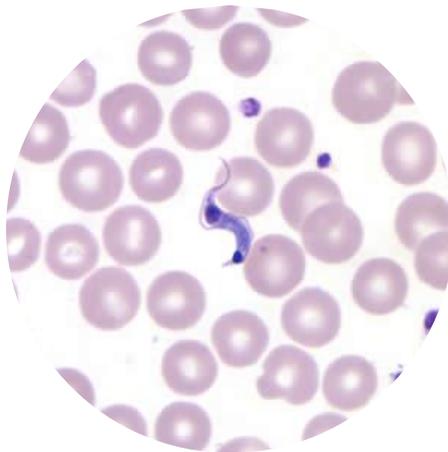
El primer caso de Mega-colón en México se describió en Oaxaca por un cuadro de constipación de tres semanas, con la formación de un fecaloma, donde el único tratamiento fue la cirugía (Secretaría de Salud, 2019) (Rojo-Medina et al., 2018).

En Tehuantepec, Oaxaca se reportaron casos de Miocardiopatía Chagásica, 13 pacientes del Hospital General de Salina Cruz presentaron un diagnóstico previo de miocardiopatía dilatada de origen desconocido, presentaron anticuerpos séricos contra *T. cruzi* en pruebas seroinmunológicas y se confirmó la presencia de anticuerpos IgG, fueron un total de 7 hombres y 6 mujeres entre 45 y 69 años de edad, todos nacieron y crecieron en localidades rurales en los municipios de Pochutla, Yautepec, Tehuantepec y Juchitán; su vivienda era pobre con paredes de barro o adobe, techo de palma y pisos de tierra, sin servicios de agua, ni drenaje, hubo hacinamiento y 11 de los 13 enfermos conocían al triatomino. El ECG mostró trastornos del ritmo con fibrilación auricular, arritmias, trastornos en la conducción y bloqueo de la rama derecha del Haz de His (BRDHH) (Moreno López et al., 2001).

En 2011, Villalobos y colaboradores realizaron un trabajo en el estado de Oaxaca, específicamente en el istmo de Tehuantepec, con el fin de conocer la biología de *M. phyllosoma*, en el cual observaron que el hábitat de este vector es dentro de viviendas humanas y también se ubica en el área peridoméstica (Villalobos et al., 2011).

## 2.2 Trypanosoma cruzi

*Trypanosoma cruzi* es un protozooario flagelado (Figura 9), responsable de la Tripanosomiasis americana, descubierto en 1909, también por Carlos Chagas. La caracterización genética consensuada de *T. cruzi* divide a esta especie en siete grupos genéticos, denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU), que van de TcI a TcVI y Tcbat, los cuales tienen distribución geográfica y ecología dispersa en América Latina (Telleria *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Tripomastigote sanguíneo. Tomado de:  
<http://www.contagium.org/tag/enfermedad-de-chagas/>

Diversos autores proponen que la diversidad genética de *T. cruzi* se encuentra asociada con diferentes ciclos de transmisión y huéspedes, así como con la sintomatología en pacientes (Villanueva-Lizama *et al.*, 2019).

Distintos estudios indican que los linajes TcIII y TcIV son encontrados principalmente en animales silvestres, mientras que los linajes restantes parecerían estar relacionados con los ciclos de infección peridomésticos y domésticos, encontrándose en pacientes infectados. Sin embargo, el linaje TcIV y TcI han sido identificados en brotes infecciosos humanos en zonas selváticas, posiblemente relacionados con la vía de transmisión oral del parásito.

El grupo TcI es el genotipo más abundante y ampliamente distribuido en América, es considerado la causa principal de los casos agudos en humanos y asociado con

el desarrollo de cardiopatías en casos crónicos de la enfermedad. (Zingales *et al.*, 2012).

En cuanto a la fase clínica, se ha podido determinar, en algunos casos, la relación entre el genotipo y el tipo de manifestación en la etapa crónica de la enfermedad (Tabla 1).

Las presentaciones clínicas de TcI incluyen cardiomiopatía chagásica y en individuos inmunocomprometidos se ha podido determinar severos casos de meningoencefalitis. En regiones donde se ha detectado la presencia de TcII, TcV y TcVI (región del cono Sur), se presentan casos de cardiomiopatía chagásica severa y algunos casos muy desarrollados de megaesófago y mega-colón. Sin embargo, TcIII pareciera no estar implicado en infecciones crónicas y algunos reportes sugieren que TcIV podría estar relacionado con las manifestaciones clínicas que presenta TcI, pero esto aún no ha podido ser comprobado (Zingales *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Características clínicas y localización geográfica de las Unidades de Tipificación Discretas de *T. cruzi*.

DTU	Características clínicas	Localización
TcI	Miocardopatía chagásica y meningoencefalitis	Amazonía, América del Norte, Centro y Sur.
TcII	Cardiomiopatía y megasíndromes digestivos	Brasil y Cono Sur
TcIII	Rara en humanos	De Venezuela hasta Argentina
TcIV	Casos de brotes orales en la Amazonía brasileña	América del Norte y del Sur
TcV	Cardiomiopatía y megasíndromes digestivos	Cono Sur, Gran Chaco
TcVI	Cardiomiopatía y los megasíndromes digestivos	Ecuador, Colombia, Cono Sur y el Gran Chaco
Tc bat	Presente en murciélagos	Panamá, Colombia y Brasil

### 2.2.1 Taxonomía

*Trypanosoma cruzi* pertenece a la familia Trypanosomatidae, la cual está incluida en el orden Kinetoplastida que representa uno de los linajes más antiguos de los organismos eucariotas que contienen mitocondrias.

### 2.2.2 Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

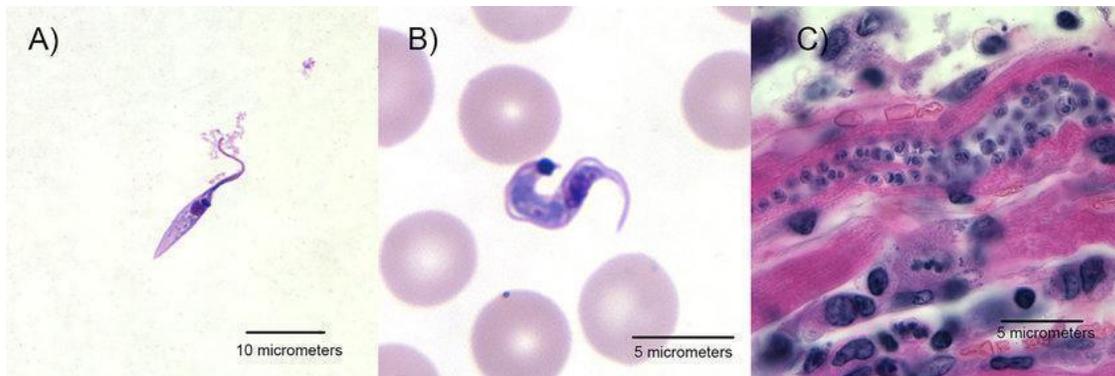
Reino:	<b>Protista</b>
Subreino:	<b>Protozoa</b>
Phylum:	<b>Sarcomastigophora</b>
Clase:	<b>Zoomastigophora</b>
Orden:	<b>Kinetoplastida</b>
Familia:	<b>Trypanosomatidae</b>
Género:	<b>Trypanosoma</b>
Subgénero:	<b>Schizotrypanum</b>
Especie:	<b><i>Trypanosoma cruzi</i></b>

### 2.2.3 Morfología

*Trypanosoma cruzi* es un organismo que se caracteriza por poseer una sola mitocondria, en donde se sitúa una estructura especializada que contiene ADN, llamado cinetoplasto o k-ADN. El ADN presente en esta estructura se encuentra organizado en forma de mini círculos y representa el 20 % del total de ADN del parásito (De Souza *et al.*, 2010).

La reproducción en *T. cruzi* es principalmente asexual por fisión binaria, aunque existe evidencia de hibridación, intercambio genético entre aislados y reproducción sexual. Existen dos teorías sobre la diversidad genética del parásito: (1) la teoría clonal, donde se propone que todos los descendientes poseen un genotipo igual al fundador y no existe la recombinación, y (2) *T. cruzi* puede reproducirse sexualmente, por un mecanismo similar a la meiosis (Herrerros-Cabello *et al.*, 2020; Zingales *et al.*, 2012).

El cariotipo del parásito muestra una variabilidad en el tamaño y número de cromosomas entre los aislados, incluso entre clonas, usualmente el parásito es descrito como diploide y el tamaño de los cromosomas varía de 0.45 a 4 Mb y el número de 19 a 40. El tamaño del genoma se estima entre 80 y 150 Mb (Herrerros-Cabello *et al.*, 2020).



**Figura 10.** Formas de *Trypanosoma cruzi*. A) Epimastigote en cultivo (tinción de Giemsa). B) Tripomastigote sanguíneo de un paciente en fase aguda. C) Nido de amastigotes en tejido cardíaco de un paciente en fase crónica (tinción hematoxilina y eosina). Tomado de: (Bern *et al.*, 2019).

*T. cruzi* presenta tres etapas de desarrollo como se observa en la Figura 10, cada etapa se presenta, de acuerdo a las condiciones de alojamiento, la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo celular y la aparición del flagelo, son diferentes en cada fase (Tabla 2). Las formas que se presentan en el insecto vector son epimastigote y tripomastigote metacíclico, mientras que en los mamíferos se encuentran las formas de tripomastigote sanguíneo y amastigote (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019).

*T. cruzi* presenta tres estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico o sanguíneo, epimastigote y amastigote.

**Tabla 2.** Actividad biológica y formas de desarrollo de *T. cruzi*.

Forma	Morfología	Actividad Biológica	Localización o Alojamiento
<b>Tripomastigote sanguíneo</b>	Flagelo libre que se origina después del núcleo. Membrana ondulante extensa 20-25µm	Forma no replicativa infectiva	Sangre del hospedero mamífero. Cultivos celulares
<b>Amastigote</b>	Forma redondeada, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto. Mide aproximadamente 2-5 µm	Forma replicativa Infectiva para mamíferos	Células del hospedero mamífero o en cultivo celular
<b>Tripomastigote metacíclico</b>	Forma alargada, flagelado, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo.	Forma no replicativa infectiva	Deyecciones y orina del insecto vector o en cultivo
<b>Epimastigote</b>	Fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante, miden entre 20 y 40 µm de largo.	Forma no replicativa infectiva	Intestino, deyecciones y orina del insecto vector o en medios de cultivo líquidos

#### 2.2.4 Ciclo de vida

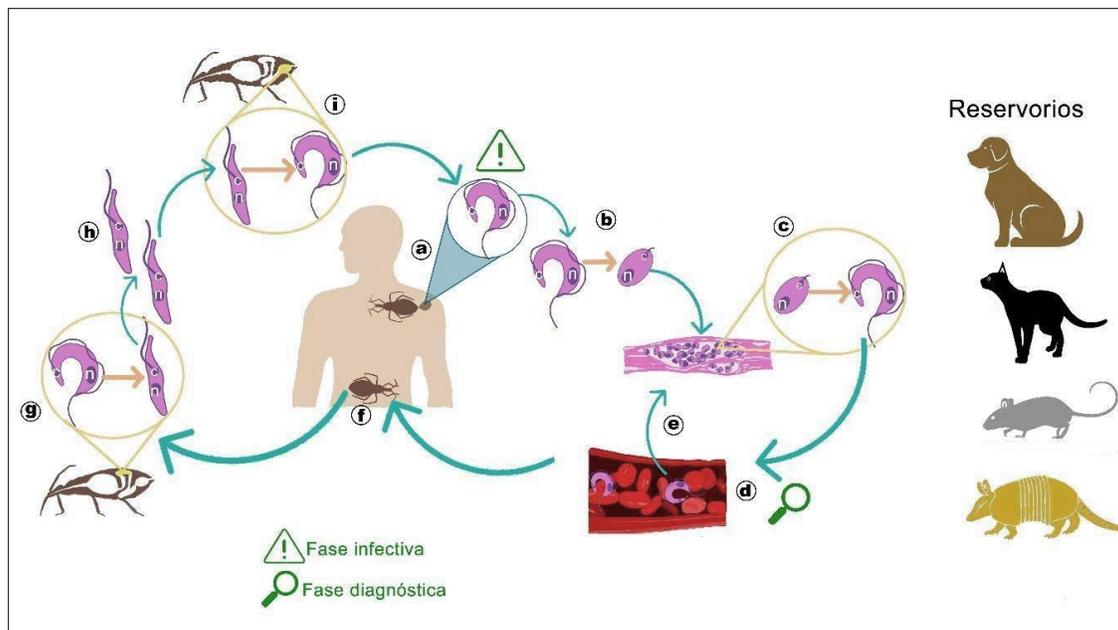
El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* ocurre en dos tipos de huéspedes, los vertebrados y los invertebrados. Entre los primeros se encuentran algunas especies de mamíferos (incluidos los humanos) los cuales actúan como reservorios. Los huéspedes invertebrados son diversas especies de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera; Reduviidae) (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019; Telleria *et al.*, 2017).

El ciclo de vida de *T. cruzi* en el insecto vector inicia cuando este se alimenta de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos, los cuales pasan al estómago (intestino medio anterior) del vector, una vez establecidos en su nuevo ambiente, los tripomastigotes sanguíneos comienzan a diferenciarse en epimastigotes y esferomastigotes. Los epimastigotes llegan al intestino donde se lleva a cabo su multiplicación fisión binaria, adhiriéndose por la región del flagelo a la membrana perimicrovellosa (intestino medio posterior), secretada por las células intestinales. Los epimastigotes se separan de la membrana y se dirigen al recto, una vez situados en la región posterior del intestino, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales se adhieren al epitelio del recto y al saco rectal del insecto. Cuando el insecto se alimenta, los tripomastigotes metacíclicos se liberan del recto por la orina o las deyecciones.

El ciclo de vida de *T. cruzi* continua en el hospedero vertebrado cuando un triatomino infectado después de alimentarse, deposita deyecciones que contienen formas infectivas de *T. cruzi* llamadas tripomastigotes metacíclicos. Estas formas presentan gran movilidad, la cual ayuda a la penetración de la piel, ya sea por medio de lesiones o a través de las mucosas hasta llegar al torrente sanguíneo. *T. cruzi* tiene la capacidad de infectar por medio de fagocitosis diferentes tipos de células,

como macrófagos, células musculares, epiteliales o neuronas. Una vez realizando fagocitosis en cualquiera de estas células, el tripomastigote se transforma en amastigote, el cual lisa la membrana de la vacuola que lo contiene, provocando que en el citoplasma de la célula ocurre la replicación por fisión binaria, haciendo que se sature el citoplasma de la célula infectada (Liu *et al.*, 2015).

Los amastigotes inician su diferenciación a tripomastigotes sanguíneos, los cuales muestran un movimiento constante e intenso, cuando la membrana celular se rompe, los tripomastigotes son liberados al espacio extracelular y se dirigen a infectar nuevas células (Figura 11) (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2010).



**Figura 11.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. a) El triatominio se alimenta del huésped y deyecta, las deyecciones contienen tripomastigotes metacíclicos que penetran la piel e infectan células, b) Dentro de las células, los tripomastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes, c) Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en los tejidos y se transforman en tripomastigotes sanguíneos, d) Los tripomastigotes sanguíneos lisan las células que los contienen y entran en el torrente sanguíneo, e) Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células

y transformarse en amastigotes, f) El triatomino se alimenta con la sangre del huésped infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos, g) Los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector, h) Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio y migran hacia el recto del vector, i) En el recto, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se liberan en las deyecciones del triatomino (Peña-Callejas *et al.*, 2022).

## 2.3 Vector

Los vectores de *Trypanosoma cruzi* son insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae conocidos comúnmente como chinche besucona o en Argentina “vinchucas”. Los triatominos domiciliados son capaces de colonizar viviendas mal construidas en las zonas rurales, suburbanas y urbanas.

### 2.3.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del vector *M. phyllosomus* es la siguiente:

Reino:	<b>Animalia</b>
Phylum:	<b>Artropoda</b>
Clase:	<b>Insecta</b>
Orden:	<b>Hemíptera</b>
Familia:	<b>Reduviidae</b>
Subfamilia:	<b>Triatominae</b>
Género:	<b><i>Meccus</i></b>
Especie:	<b><i>Meccus phyllosomus</i></b>

### 2.3.2 Distribución geográfica

La modificación de los ecotopos naturales han sido clave para la invasión y adaptación de los vectores en las viviendas humanas, y con ellos, el establecimiento de la transmisión de la enfermedad en entornos urbanos.

Diferentes especies de triatominos se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. La distribución de los triatominos en el continente americano se debe a su tolerancia a una diversa gama de ambientes, siendo factores bióticos y abióticos los que modulan la distribución de éstos. Entre los factores bióticos se encuentran la diversidad de alimentos y la presencia o ausencia de la infección por *T. cruzi*. En el caso de los factores abióticos, la temperatura.

Mientras que la mayoría de los triatominos prefieren habitar ambientes silvestres, existen ciertas especies que han podido colonizar y adaptarse a las viviendas humanas, causando que el ciclo de transmisión ocurra entre humanos. (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2020)

Existen 149 especies de triatominos en el mundo. Estas especies se encuentran clasificadas en 5 tribus (Triatomini, Rhodniini, Alberproseniini, Bolboderini y Cavernicolini) y 17 géneros (Mouğabure-Cueto *et al.*, 2015).

Las especies pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Meccus*, se consideran los principales vectores de *T. cruzi* en animales domésticos y humanos. Se distribuyen ampliamente en el continente americano, desde México hasta Argentina y Chile (Martínez-Ibarra *et al.*, 2017b).

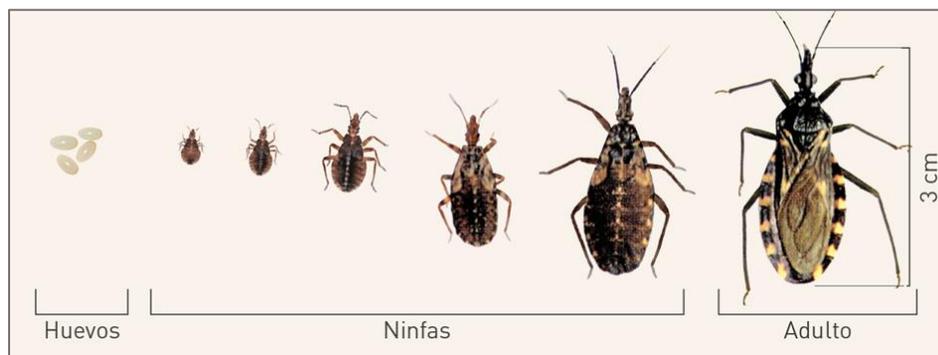
En México se han reportado 34 especies de triatominos, en su mayoría endémicas en el país (Morales-Moran *et al.*, 2021) 19 pertenecen al género *Triatoma*, que es de suma importancia por su hábitos domiciliarios y estrecho contacto con la vivienda humana, además de que en este género se incluyen la mayoría de las especies que se han encontrado infectadas naturalmente por *T. cruzi* (Zarate *et al.*, 1985) (Salazar-Schettino *et al.*, 2010).

### 2.3.3 Biología del vector

La mayoría de las especies de triatominos viven en ecotopos silvestres y están asociados con nidos y refugios pequeños de mamíferos y aves, donde aproximadamente 100 especies de mamíferos y algunas especies de reptiles participan en el ciclo de transmisión de este parásito.

En ambientes silvestres, el parásito circula entre hospederos vertebrados e insectos vectores, lo que resulta un ciclo de transmisión silvestre. Cuando los triatominos entraron en contacto con las viviendas humanas, los humanos se convirtieron en una de sus fuentes potenciales de alimento y, como consecuencia, los humanos comenzaron a participar también en el ciclo de vida de *T. cruzi*, conocido como ciclo doméstico.

Los triatominos son insectos cuyo desarrollo comprende el huevo, cinco estadios ninfales y el imago o adulto (Figura 12) (de Oliveira *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Ciclo de vida de los triatominos. Tomada de:

[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

Son hematófagos y la mayoría se alimenta de sangre de mamíferos o aves, aunque existen algunos reportes sobre algunas especies que pueden alimentarse de sangre de reptiles o anfibios (De Oliveira *et al.*, 2018; Murillo-Solano *et al.*, 2021). También se ha reportado que algunas especies de triatominos pueden alimentarse de otras fuentes de alimentación, por ejemplo: la savia de las plantas, azúcar de forma

experimental, sangre consumida por otros insectos (cleptohematofagia), ingestión de deyecciones de otros triatominos (coprofagia) o la succión de hemolinfa de otros triatominos (hemolinfagia) (Genta *et al.*, 2016) (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2020). Se alimentan de sangre durante los cinco estadios de ninfa y como adultos, variando la cantidad de sangre que ingieren según la especie y la etapa de vida en la que se encuentran (Gascón *et al.*, 2008) (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2020).

Estos insectos por lo general son de hábitos nocturnos y durante el día permanecen en acinesia (sin movimiento) en sus refugios (grietas, entre hojas, debajo de la corteza de los árboles o basura), aunque a veces pueden salir a alimentarse durante el día en condiciones adversas cuando llegan a alimentarse de reptiles (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2020). Cuando pican a los hospederos humanos durante la noche, lo hacen en partes descubiertas del cuerpo que están frecuentemente expuestas (por eso se cree que tienen preferencia por picar en la cara) y las picaduras son indoloras debido a que la saliva de los triatominos tiene una acción anestésica y anticoagulante. (Rojo-Medina *et al.*, 2018; Sant'Anna *et al.*, 2017).

En ausencia de luz, los triatominos pueden percibir señales químicas, pero la señal física más importante es el calor, ya que su sensibilidad térmica les permite percibir la temperatura y localizar los vasos sanguíneos, permitiendo alimentarse de manera más eficiente.

En localidades donde existe la presencia de Triatominos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda a los servicios médicos calcular cuatro índices entomológicos: índice de infestación (casas positivas para triatominos/número de casas examinadas x 100); índice de colonización (casas con ninfas de triatominos/número de casas positivas para triatominos X 100); índice de hacinamiento (triatominos capturados/número de casas positivas para triatominos x 100) e índice de infección natural (triatominos positivos para *T. cruzi*/ números de triatominos examinados x 100) (Consultation & Office, 2009; Villalobos *et al.*, 2011).

#### 2.3.4 *Meccus phyllosomus*

El género *Meccus* revalidado del complejo *Triatoma phyllosoma* (Carcavallo *et al.*, 2000; Martínez-Ibarra *et al.*, 2008) incluye seis especies: *M. pallidipennis*, *M. longipennis*, *M. picturatus*, *M. mazzotti*, *M. bassolsae* y *M. phyllosomus*, los cuales se encuentran distribuidos en México, siendo responsables del 74% de la transmisión de *T. cruzi* a reservorios en la zona (Díaz *et al.*, 2017b). Esta especie se ha encontrado en viviendas del sur de México, alojados en piedras, leña, vallas de madera, cemento y ladrillo (Martínez-Ibarra *et al.*, 2017b).



**Figura 13.** Ejemplares hembra y macho de *Meccus phyllosomus*. Cortesía: Dra. Any Laura Flores Villegas, Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología de Parásitos, FacMed, UNAM.

*Meccus phyllosomus* es un grupo que se encuentra distribuido en el sur de México, donde es considerado de importancia epidemiológica por la estrecha cercanía con la población de la región (Díaz *et al.*, 2017), específicamente a lo largo de la costa del pacífico del estado de Oaxaca (Salazar-Schettino *et al.*, 2010).

*Meccus phyllosomus* (Martínez-Ibarra *et al.*, 2017) sólo se ha reportado en México en el estado de Oaxaca, se ha encontrado en una altura entre 10 y 1200 msnm (Salazar-Schettino *et al.*, 2010). La hembra mide entre 29-39.5 mm y el macho 26.5

a 38.00 mm (Figura 13) (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). Vidal *et al.*, 2000 reportó en Oaxaca la captura de 33 ejemplares, 3 (9.1%) fueron positivos a *Trypanosoma cruzi*.

Se ha estimado que este vector posee un alto riesgo de transmisión de *T. cruzi* en 643 localidades de Oaxaca, afectando 74 798 viviendas y con una población en riesgo de 353,591 habitantes (Ramsey *et al.*, 2000). Su hábitat intradomiciliario incluye viviendas construidas con hojas de palma, cercanas a la cama, en el peridomicilio se localizan en gallineros y acúmulos de piedras. En la comunidad de Tehuantepec, más del 80% de las viviendas están construidas con cemento, por lo cual se localizan en el peridomicilio, en estos ecotopos se ha reportado que el perro, la sangre de humano y las gallinas son la principal fuente de alimentación (Villalobos *et al.*, 2011).

El ciclo de vida de huevo a adulto de *Meccus phyllosomus* es de  $172.7 \pm 21.4$  días, el porcentaje de eclosión de los huevos es del 79% con un período de incubación de 20 días (Martínez-Ibarra *et al.*, 2006). Tiene la capacidad de formar híbridos entre especies del mismo género y con aquellas filogenéticamente cercanas como *Triatoma recurva*, lo cual aumenta el riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi*. Dichos híbridos presentan un ciclo de vida más corto, pero un incremento en el número de hembras (hembras y machos proporción 2:1), su fecundidad es ligeramente mayor y el porcentaje de eclosión de huevos es significativo, dichos parámetros biológicos indican un fenómeno de “heterosis” o vigor híbrido, lo cual ocasiona mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* (Díaz *et al.*, 2017a). Estos híbridos se asocian con resistencia a los insecticidas y altos índices entomológicos.

*Meccus phyllosomus* es una especie que se encuentra en simpatría (viven en la misma área geográfica) con otras especies como *Meccus mazzottii* y *Meccus pallidipennis*, en las tres especies se han encontrado altos índices de infección con *T. cruzi*. Ramsey *et al.*, 2000 señalaron que *M. phyllosomus* también puede compartir nicho ecológico con *Triatoma bolivari* (Ramsey *et al.*, 2000).

La precipitación anual parece una limitante para la distribución de esta especie, ya que no se ha colectado en áreas de Oaxaca donde la precipitación anual excede 1.5 m, condiciones que prevalecen en la región norte del estado.

La infección por *T. cruzi* decrece con la altitud en este vector, los ejemplares de *T. phyllosoma* colectados arriba de 800 m. s. n. m. no presentan infección (Ramsey et al., 2000). En un estudio realizado en Oaxaca, se demostró que en localidades entre los 0-399 metros el índice de colonización es de 0.4, el de infestación de 8.2% y la infección del 47.6%, en 400-700 el índice de colonización es de 0.2, el de infestación 7.3% y la infección es de 66.7%, entre 800-1200 el índice de colonización es de 0.5, el de infestación 5.1% y la infección es de 0% (Ramsey et al., 2000).

En un estudio realizado en el Istmo de Tehuantepec, se estudiaron dos comunidades: San Mateo del Mar (10 m. s. n. m.) y Tehuantepec (99 m. s. n. m.), para la búsqueda de *Triatoma phyllosoma*, en la primera el índice de infestación fue de 11.7 % y un índice de colonización del 88.8% a diferencia de la segunda localidad donde del índice de infestación fue de 9.8% y un índice de colonización del 100 %. Se examinaron las deyecciones de 137 triatominos, principalmente de quinto estadio y adultos, encontrando un 2.1% de prevalencia de *T. cruzi* en San Mateo del Mar y 39.4 % en la ciudad de Tehuantepec (Villalobos et al., 2011). El parásito *T. cruzi* comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos.

## 2.4 Caracterización del aislado

El comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi* (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019).

### 2.4.1 Caracterización biológica

La caracterización biológica de las diferentes cepas de *T. cruzi* se determina mediante diversos parámetros, tales como: periodo prepatente, nivel de parasitemia, tropismo celular y sobrevivencia, los cuales son parámetros útiles para determinar la virulencia (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019).

### 2.4.2 Periodo prepatente

El periodo prepatente es el tiempo transcurrido desde la infección con el parásito hasta el momento en el que se puede detectar la presencia de tripomastigotes en el torrente sanguíneo del huésped, es un indicador de la tasa de replicación del parásito y se puede ver modificado por la vía de inoculación, la fase del parásito, el linaje de la cepa y la respuesta inmune del huésped.

### 2.4.3 Parasitemia

La parasitemia es la presencia de parásitos en el torrente circulatorio, permite estimar la intensidad de la infección, la que, a su vez, se relaciona con la severidad de las manifestaciones clínicas. Los niveles de parasitemia varían de acuerdo a la especie del vector de la cual fue aislado el parásito por primera vez.

#### 2.4.4 Tropismo

*T. cruzi* puede invadir diversas células de un hospedero y cada cepa muestra diferente afinidad por algún tejido en específico. Por ejemplo, existe evidencia que demuestra que el linaje TcI presenta un tropismo celular para músculo cardíaco, mientras que el linaje TcII invade principalmente el intestino y el esófago.

#### 2.4.5 Mortalidad

La mortalidad se refiere a la pérdida de modelos experimentales en los grupos de comparación.

#### 2.4.6 Moleculares

Las variaciones geográficas en la prevalencia y gravedad de las formas clínicas han sido asociadas con aspectos inmunológicos y/o genéticos de las diferentes poblaciones humanas y/o a la complejidad genotípica de la población del parásito. Hasta el momento, distintas tipificaciones bioquímicas y moleculares realizadas sobre múltiples aislamientos o cepas del parásito han permitido delinear al menos 6 linajes evolutivos dentro de *T. cruzi*, llamados TcI a TcVI. Estos linajes muestran diferencias con respecto a la infectividad en el insecto vector, invasión y multiplicación intracelular in vitro, tropismo tisular, virulencia y susceptibilidad a drogas en modelos animales definidos.

#### 2.4.7 Identificación molecular de *T. cruzi*

Las técnicas de biología molecular para detectar *T. cruzi* se caracterizan por su alto nivel de sensibilidad y especificidad, debido a que son capaces de detectar el ADN (ácido desoxirribonucleico) del parásito a partir de pequeñas cantidades. Estas

técnicas son basadas en la detección de fragmentos específicos de ADN del parásito, como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction” (Ferrer *et al.*, 2015).

Para realizar la técnica de PCR es necesario utilizar iniciadores, cebadores o también llamados “primers”, los cuales funcionan como delimitadores en la amplificación de ADN, dando como resultado la amplificación de un fragmento específico de ADN, el cual se puede visualizar con ayuda de un gel de agarosa, que es tratado con compuestos fluorescentes que se intercalan en el ADN, para después realizar una electroforesis y finalmente visualizar una banda con la fluorescencia a la luz UV.

#### 2.4.9 Mini-exón

Existen diferentes marcadores bioquímicos y moleculares que se han utilizado para encontrar una relación entre la diversidad genética del parásito y sus características biológicas, uno de ellos es el espaciador intergénico de los genes mini-exón, el cual ayuda a diferenciar dos grupos filogenéticos; *T. cruzi I* y *T. cruzi II*. Esta identificación es muy importante, ya que permite establecer asociaciones entre la taxonomía, la biología del parásito, el desarrollo de la enfermedad y diferentes parámetros epidemiológicos (Botero *et al.*, 2007).

Los primers utilizados para la identificación de grupos filogenéticos con ayuda de mini- exón, amplifican un fragmento de 350 pb para el grupo *T. cruzi I* y un fragmento de 300 pb para el grupo *T. cruzi II*.

#### 2.4.10 Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA)

En el año 2002, Di Noia y colaboradores describieron una proteína de *T. cruzi* expresada en la superficie de los tripomastigotes (Di Noia *et al.*, 2002).

TSSA es una proteína de *T. cruzi* expresada en la superficie del tripomastigote a la cual llamaron antígeno pequeño de la superficie del tripomastigote (Trypomastigote Small Surface Antigen), que genera una fuerte respuesta humoral en humanos y animales infectados.

En la actualidad se han descrito al menos 6 isoformas mayoritarias de TSSA, las cuales se encuentran en los diferentes linajes de *T. cruzi* (TcI a VI), sugiriendo el uso potencial de esta molécula en la tipificación indirecta, usando técnicas serológicas.

### 3 Justificación

En el mundo existen alrededor de seis millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), de las cuales cerca de un millón pertenecen a población mexicana. Las condiciones de vivienda en diversas áreas del país favorecen la presencia del insecto transmisor, por ello aumenta el riesgo de adquirir la enfermedad vía vectorial. Actualmente, cerca de setenta millones de personas en el mundo están en riesgo de infectarse con *T. cruzi*, lo cual representa un problema de salud pública.

Oaxaca se encuentra entre los principales estados del país que presentan más casos con enfermedad de Chagas. En localidades del Istmo de Tehuantepec se han reportado casos autóctonos de cardiomiopatía, megaesófago y megacolon asociados con *T. cruzi*. Aunado a la diversa cantidad de especies de triatomos que presenta.

*Meccus phyllosomus* (*T. phyllosomus*), es una de las especies de mayor importancia epidemiológica, se ha reportado únicamente en el istmo de Tehuantepec, Oaxaca, ya que presenta algunas exigencias ecológicas (altitud de 10 a 1200 msnm y precipitación de 1.5 m) que limitan su distribución y su dispersión.

El riesgo de infectarse por *T. cruzi* para las poblaciones humanas de esa región es de importancia, por lo que se requiere aplicar medidas de control para esos vectores.

Para esta investigación se eligieron tres localidades del istmo de Tehuantepec: Tehuantepec, Vixhana y Guichivere, con el objetivo de determinar el comportamiento de los aislados de *T. cruzi*, obtenidos de la especie *M. phyllosomus* (infectadas naturalmente) en el modelo murino CD-1, a través del monitoreo de parasitemia, sobrevivencia y la expresión del gen TSSA en cuatro tejidos (corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro).

## 4 Preguntas de Investigación

- ¿Existe diferencia significativa entre la parasitemia, sobrevivencia y el tropismo de los tres aislados provenientes de *Meccus phyllosomus*?
- ¿El aislado con mayor grado de parasitemia es también el que presenta mayor porcentaje de mortalidad?
- ¿Cómo será la expresión del gen TSSA en los órganos de estudio?

## 5 Hipótesis

Los aislados de *Trypanosoma cruzi* presentan diferencias en el comportamiento biológico en el modelo murino cuando provienen de diversos vectores, estas diferencias se observan en la parasitemia, sobrevivencia y tropismo tisular en ratones infectados. Por lo tanto, en los aislados provenientes de *Meccus phyllosomus* no habrá diferencias en la parasitemia, la sobrevivencia y el tropismo.

## 6 Objetivos

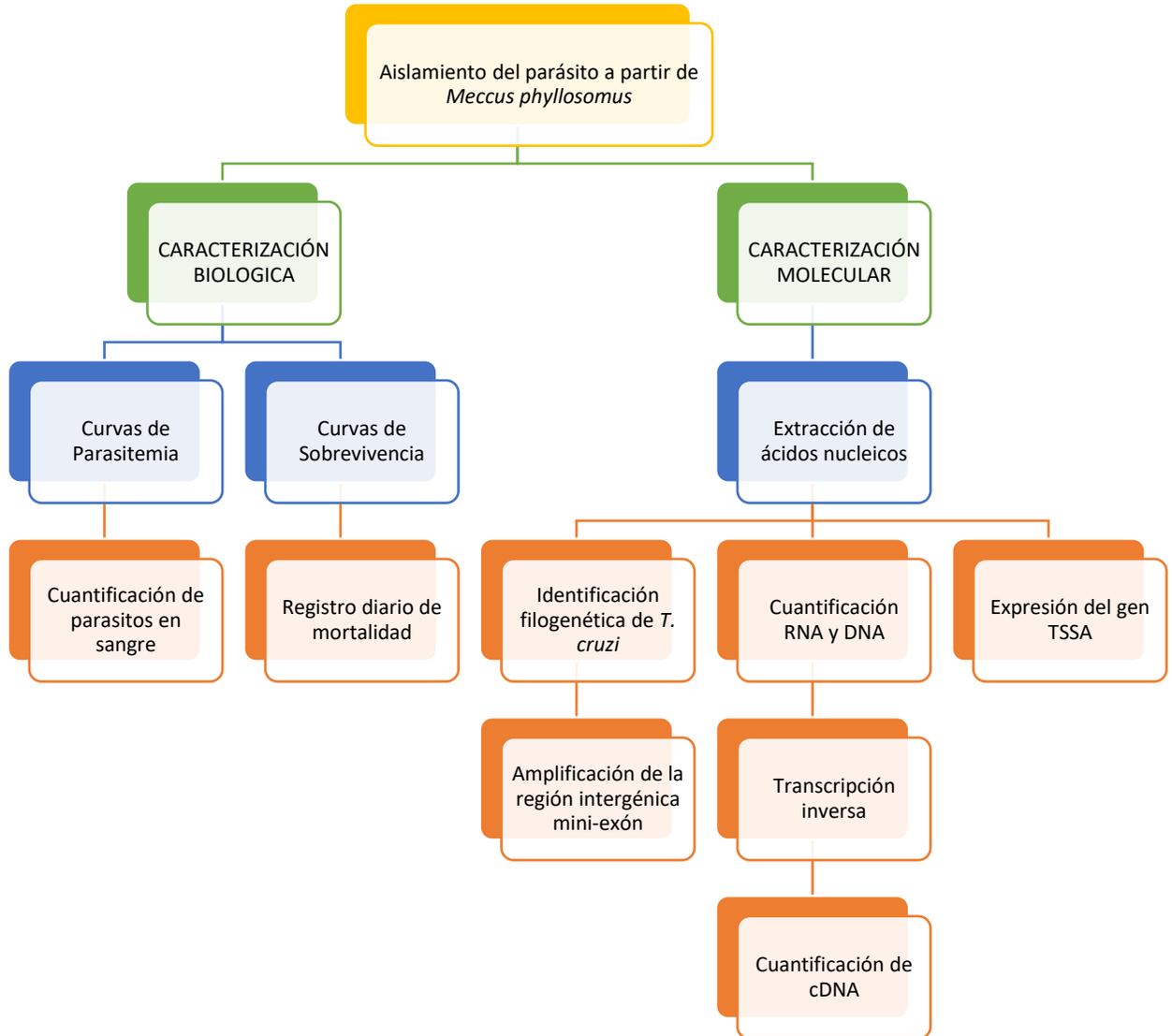
### 6.1 Objetivo General

Determinar el grado de virulencia de tres aislados de *Trypanosoma cruzi* procedentes de *Meccus phyllosomus*, mediante la cuantificación de la parasitemia, sobrevivencia/mortalidad y tropismo tisular durante la infección en ratones CD-1.

### 6.2 Objetivos particulares

- Determinar la parasitemia de tres aislados en modelo murino (CD-1).
- Determinar la sobrevivencia/mortalidad en ratones infectados con tres aislados de *Meccus phyllosomus*.
- Identificar el linaje al que pertenecen los aislados de *T. cruzi* obtenidos de *M. phyllosomus*.
- Identificar el tropismo hacia corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro en ratones CD-1 infectados, mediante la expresión del gen TSSA en corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro en ratones CD-1 infectados.

## 7 Diseño Experimental



## 8 Metodología

Como primera parte se realizó la obtención de tres aislados de estudio, los cuales fueron establecidos en modelo murino previamente para la cuantificación de parasitemia y sobrevivencia, así como el tropismo evaluado mediante la expresión de TSSA en órganos

### 8.1 Origen de aislados

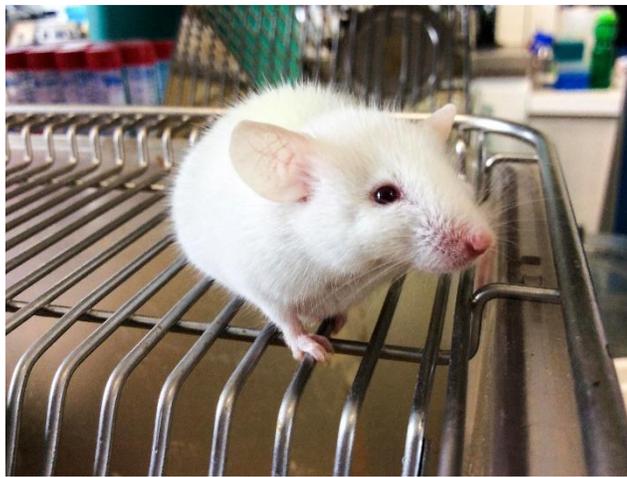
Los aislados utilizados se obtuvieron de las deyecciones de triatomino de la especie *Meccus phyllosomus* infectados con *T. cruzi* provenientes de Oaxaca, México (Tabla 3). Los insectos fueron colectados en el año 2017 en las localidades abajo descritas, para su identificación se utilizó la clave de Lent y Wygodzinsky, 1979 (Wygodzinsky y Lent, 1979). La nomenclatura empleada es acorde a la WHO (Favila-Ruiz *et al.*, 2018).

**Tabla 3.** Nombre y Procedencia de los aislados

NOMENCLATURA	ESPECIE DE TRIATOMINO	ZONA GEOGRÁFICA
<b>Tehuantitla</b> (ITRI/MX/17/TEHUANTITLA)	<i>M. phyllosomus</i> Hembra 	Tehuantitla, Mpio. Tehuantepec, Oax. 50 m. s. n. m. Latitud 16°19'3"N Longitud 95°15'8"W
<b>Vixhana</b> (ITRI/MX/17/VIXHANA)	<i>M. phyllosomus</i> Hembra 	Vixhana, Mpio. Tehuantepec, Oax. 43 m. s. n. m. Latitud 16°19'3"N Longitud 95°15'8"W
<b>Guichivere</b> (ITRI/MX/17/GUICHIVERE)	<i>M. phyllosomus</i> Macho 	Guichivere, Mpio. Tehuantepec, Oax. 33 m. s. n. m. Latitud 16°19'3"N Longitud 95°15'8"W

## 8.2 Modelo animal

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron ratones (CD-1) hembras de 4-6 semanas de nacidos, de 18 a 22 g (Figura 14). Fueron controlados en un ciclo de 12 horas luz-oscuridad, temperatura y humedad, agua y alimentos ad libitum, según las recomendaciones y criterios establecidos por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (**CICUAL**) y la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

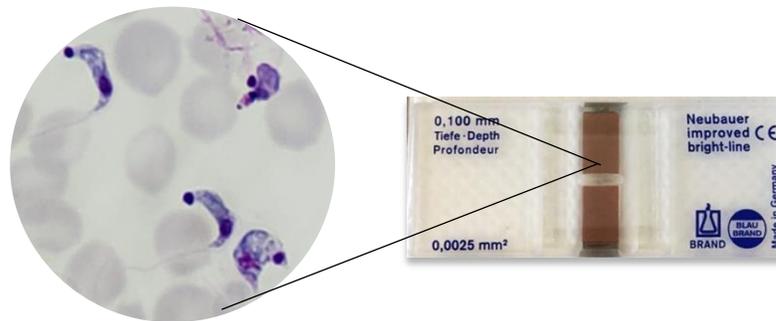


**Figura 14.** Modelo experimental. Ratón hembra CD-1

## 8.3 Determinación de curva de parasitemia

Los animales fueron inoculados con un millón de parásitos ( $1 \times 10^6$  parásitos/mL) cada uno por vía intraperitoneal. Se utilizaron 32 ratones por cada aislado de estudio ( $n=32$ ) y un grupo control de 16 ratones, estos últimos inoculados con citrato de sodio (3.8%) por vía intraperitoneal. Los grupos experimentales en cada caso fueron 8 ratones infectados/4 testigos por cada repetición (4 repeticiones en total). Cada tercer día se realizó una toma de muestra sanguínea, la cual fue obtenida por medio de un corte de la parte distal de la cola del ratón. Se realizó el conteo de parásitos

en cámara Neubauer con 10  $\mu\text{l}$  de la sangre obtenida en dilución 1:10 con citrato de sodio (3.8 %), obteniendo el número de tripomastigotes sanguíneos presentes en cada muestra por microscopía óptica (40x) (Figura 15). La parasitemia se cuantificó hasta la muerte del ratón y en los controles por un periodo de 30 días. La parasitemia máxima se define como el promedio del número de parásitos en el día en el que se presenta la mayor parasitemia.



**Figura 15.** Cámara Neubauer utilizada para el conteo de tripomastigotes sanguíneos.

#### 8.4 Determinación de Supervivencia

Para determinar la supervivencia se realizó una observación diaria en los tres grupos de ratones infectados y el grupo control durante 30 días, en el cual se registró el número de eventos diarios de muerte y se observaron en los ratones algunos signos de infección. La supervivencia se define como el número de ratones que persisten al final del experimento (30 días), la supervivencia media es el día en el que se produjo el 50% de la mortalidad en los ratones.

## 8.5 Extracción de Órganos

Los órganos fueron obtenidos para la extracción de RNA total de cada tejido. Posterior al sacrificio por eutanasia en los días significativos posteriores a la infección (14, 18, 20 y 22). Se obtuvieron corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro (Figura 16) de dos ratones infectados y uno del grupo control por cada día significativo, cada órgano fue depositado en criotubos de 1.5 mL y posteriormente se colocaron en varillas de almacenamiento, se introdujeron en nitrógeno líquido durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron y con ayuda de pistilos de plástico previamente esterilizados, se trituraron mecánicamente. Finalmente, fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.



**Figura 16.** Órganos extraídos (Esófago, corazón, cerebro y gastrocnemio).

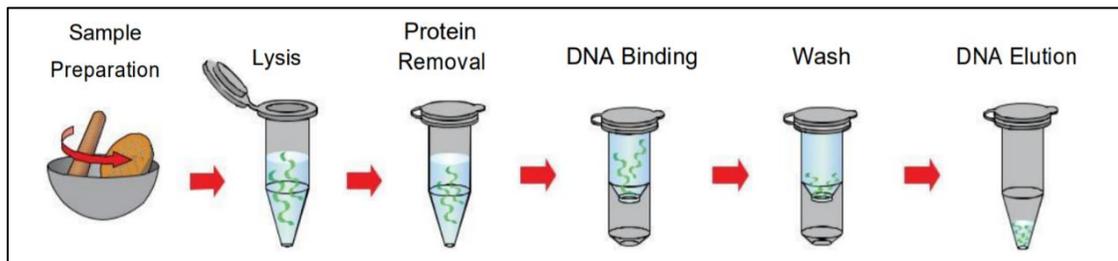
## 8.6 Identificación filogenética de *T. cruzi*

La identificación filogenética de los tres aislados de estudio se realizó mediante la identificación de la región intergénica del gen mini-exón. Se extrajo DNA de los órganos de estudio, posteriormente se realizó una PCR y finalmente se visualizaron los resultados con ayuda de una electroforesis en gel de agarosa.

## 8.7 Extracción de ADN

La extracción de DNA de los órganos de estudio para la identificación filogenética de *T. cruzi* se realizó con ayuda del kit comercial Dual Genomic DNA Isolation Kit (Tissue Reagent Dual Column Based), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 17).

1. Preparación de la muestra
2. Lisis
3. Eliminación de restos proteicos
4. DNA
5. Lavados
6. Elusión de DNA



**Figura 17.** Pasos para la extracción de DNA en tejidos.

## 8.8 Identificación de unidades discretas de tipificación mediante PCR

Se realizó la amplificación de la región intergénica del miniexón con los oligonucleótidos TC, TC1 y TC2 (Tabla 4) (Souto *et al.*, 1996), que con un producto de amplificación de 350 pb discrimina a TcI del resto de las DTU (Tabla 5), se obtiene un amplicón de 300 pb para TcII, TcV y TcVI, o la ausencia de producto de amplificación para TcIII y TcIV.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos para la identificación de *T. cruzi*.

Oligonucleótio	Secuencia (3´-5´)
TC1Fw	GTGTCCGCCACCTCCTTC
TC2Fw	CCTGCAGGCACACGTGT
TCRv	CCCTCCCAGGCCACACT

**Tabla 5.** Clasificación *T. cruzi* con mini-exón

<i>T. cruzi</i>	Pb
I	350
II	300

Se preparó la solución mix la cual contenía Buffer, dNTPs, Oligonucleótidos (Sigma-Aldrich), Taq polimerasa, agua y el ADN extraído. Las cantidades utilizadas para esta reacción se especifican en la tabla 6.

En un tubo de PCR se colocaron 9 µl de solución mix más 1µl de ADN (muestra problema), para obtener un volumen final de 10 µl. A cada tubo se le agregó 5 µl de colorante de carga ADN 6X (Thermo Fisher Scientific) para observar la corrida del gel durante el experimento.

**Tabla 6.** Reactivos y cantidades para la PCR

<b>Solución</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Buffer	1
dNTPs	0.2
Oligonucleótidos	0.4
Taq. polimerasa	0.15
Agua	7.25
ADN	1
Volumen total	10

La técnica de PCR se realizó bajo condiciones específicas para mini-exón. A continuación, se muestra la tabla con los valores de temperatura, tiempo y ciclos en los que fue realizada esta reacción (Tabla 7).

Las condiciones térmicas de PCR para las muestras de ADN usando los oligonucleótidos TC, TC1, TC2 fueron de 30 ciclos de amplificación: 94 °C durante 30s, alineamiento 30s a 55 °C y extensión 30s a 72 °C, seguido por una elongación final de 10 min. a 72 °C.

**Tabla 7.** Condiciones de temperatura para PCR Mini-exón

<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Ciclos</b>
94	30	30
94	30	30
55	30	30
72	30	30
72	10 min	30

## 8.9 Visualización de ADN

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2%, el cual fue preparado con 0.7g de agarosa más 700 µl de Tris, acetato y EDTA (TAE) SOX Buffer, aforando a 35 mL con agua Milli-Q. Finalmente se le agregó 3.5 µl de Gel red (10X) a la mezcla para la tinción y visualización de los ácidos nucleicos.

Una vez preparado el gel de corrida se cargaron 20 ul de cada muestra problema a 70 volts por una hora. Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó un transiluminador de luz UV.

## 8.10 Extracción de RNA (técnica TRIzol®)

La extracción de RNA se realizó con la técnica de TRIzol®, la cual fue adaptada y estandarizada para 100 mg de tejido.

Se añadió 1mL de TRIzol® Reagent (Life Technologies) a cada muestra de tejido a analizar y se homogenizó mecánicamente con ayuda de pistilos de plástico, la mezcla anterior se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 200 ul de cloroformo por cada mililitro utilizado de TRIzol®, se homogeneizó con ayuda del vortex y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12 000 g por 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se añadió 0.5 mL de isopropanol frío y se dejó toda la noche a -20°C.

El precipitado obtenido se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4°C y se removió el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 mL de etanol (EtOH 75 %) y se volvió a centrifugar a 7 500 g por 5 min (este lavado se llevó a cabo 2 veces), posteriormente se lavó el pellet con 1 mL de etanol (EtOH 100%) y se dejó secar sobre una toalla

absorbente, finalmente se resuspendió el pellet con 200  $\mu$ L de agua inyectable y se almacenaron las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 8.11 Cuantificación de ácidos nucleicos

Mediante espectrofotometría se determinó la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorción de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

De este modo, la concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorción obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que la relación de absorciones  $A_{260}/280$  y  $A_{260}/230$  se utilizan para evaluar la pureza de las muestras (Figura 18).

La relación  $A_{260}/280$  es muy estable y se considera que un DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0 nm. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación  $A_{260}/280 > 1.6$ . Un valor  $A_{260}/280 < 1.6$  indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Una relación  $A_{260}/280 > 2.1$  podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el DNA es puro cuando la lectura  $A_{260}/230$  se sitúa en torno 1.8-2.2. Una lectura menor de 1.8 nm se relaciona con la presencia de contaminantes en la muestra. Cuanto menor sea esta lectura, la presencia de contaminantes en la muestra será mayor.

Una relación  $< 1.5$  estaría indicando una impureza relevante en la muestra que podría comprometer su funcionalidad.

No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación  $A_{260}/280$  dependiendo de factores como la concentración de DNA o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra.

Para la cuantificación de RNA y DNA presente en todas las extracciones de tejido, se realizó un análisis de micro volúmenes de ácidos nucleicos por medio del equipo NanoDrop, en cual mide la concentración de ADN y ARN (Abs260/280 y 260/230), donde se colocó 1 µl de cada muestra problema-RNA total.

Después de cuantificar y verificar la integridad del RNA total, se utilizaron 2 µg de RNA total para la síntesis de cDNA (20 µL). Las reacciones de síntesis de cDNA se realizaron con el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems) empleando RT random primers y siguiendo la recomendación del proveedor.

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	≥1,8-2,1. <b>Pureza óptima</b>
			≥1,6-1,7. <b>Pureza aceptable</b>
			< 1,6 . <b>ADN contaminado</b> con compuestos aromáticos
			>2,1. <b>ADN contaminado</b> con ARN
	A260/230	Pureza	> 2-2,2. <b>Pureza óptima*</b>
			> 1,8. <b>Pureza aceptable*</b>
			< 1,8. <b>ADN contaminado</b> con sales, fenol, hidratos de carbono...
			< 1,5. <b>ADN altamente contaminado</b> con sales, fenol, hidratos de carbono...

\*Estos ratios sólo tendrían validez con concentraciones altas de ADN (aprox > 50ng/µl)

**Figura 18.** Valores indicativos de pureza en muestras de ADN. Tomada de: [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)

### 8.12 Transcripción Inversa (cDNA)

Una vez obtenido el RNA total de cada órgano, se realizó la reacción de transcripción inversa, para la cual, se utilizó el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems). Las cantidades empleadas en la reacción se encuentran indicadas en la tabla 8.

**Tabla 8.** Cantidades empleadas para la reacción de transcripción inversa.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/reacción (ul)</b>
<b>Buffer (10X)</b>	2.0
<b>Dntp (25X)</b>	0.8
<b>Primers</b>	2.0
<b>Transcriptasa reversa</b>	1.0
<b>Agua</b>	4.2
<b>RNA total (2µg)</b>	10
<b>Total</b>	20

Finalmente, se realizó la cuantificación del DNA obtenido durante la transcripción inversa. La cuantificación se realizó con ayuda del equipo NanoDrop, donde se colocó 1µl del DNA extraído de cada muestra problema.

### 8.13 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó mediante el método de curva estándar con oligonucleótidos específicos para los genes de *tssa* y *Actb* (ID: P60710) (Tabla 9) que codifican para la proteína de adhesión antigénica de superficie de los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (TSSA) y actina (ACTB). Los oligonucleótidos se examinaron inicialmente en busca de ausencia de dímeros o hibridación cruzada. Los oligonucleótidos utilizados fueron los que se muestran a continuación en la tabla 9 (Risso et al., 2004) (Di Noia et al., 2002).

**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5´-3´)</b>
<b>tssaFw</b>	TTTGAGGAGGCTTCTGCT
<b>tssaRv</b>	ATTCATGACTACGTGCCG
<b>ActbFw</b>	TCTGGCACCACACCTTCTAC
<b>ActbRv</b>	TTCACGGTTGGCCTTAGGGT

Los oligonucleótidos empleados tienen entre 98 - 100% de eficiencia de amplificación. El análisis de RT-qPCR se realizó utilizando las muestras de cDNA (dilución 1:10) y el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen).

El colorante de detección utilizado fue SYBR Green (2 x KAPA SYBR FAST qBioline). La qPCR se llevó a cabo bajo las condiciones de tiempo y temperatura mostradas en la tabla 10. Los datos de transcripción de tssa se normalizaron en relación con las cantidades de transcripción de Actb. Los niveles de cambio de expresión relativa se evaluaron en términos de nivel de veces de inducción con respecto al tiempo cero (ratones no infectados).

Los datos obtenidos son los valores del promedio y error estándar de al menos dos réplicas biológicas independientes, donde cada réplica biológica implica cuatro réplicas técnicas (total n= 8).

**Tabla 10.** Condiciones de tiempo y temperatura para la RT-qPCR

Temperatura °C	Tiempo (s)	Ciclos
95	10 min	1
95	15 s	35
58	30 s	35
72	30 s	35

#### 8.14 Análisis estadístico

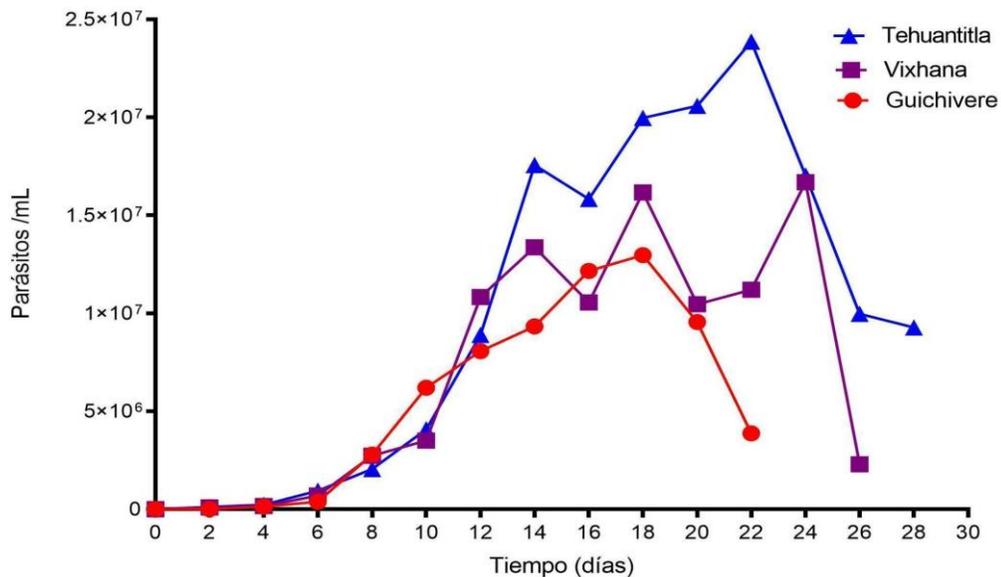
Los resultados obtenidos del conteo de parásitos para la obtención de la parasitemia entre los diferentes días, fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y si existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se realizaron pruebas pareadas de U de Mann-Whitney para encontrar qué grupos eran diferentes. Las curvas de supervivencia fueron analizadas mediante Log-Rank (Mantel Cox), utilizando los softwares Prism8 y SPSS (Ver. 25).

## 9 Resultados

Se presentan los resultados de la caracterización biológica y molecular que se realizó en los tres aislados provenientes del vector *Meccus phyllosomus*.

### 9.1 Curvas de Parasitemia

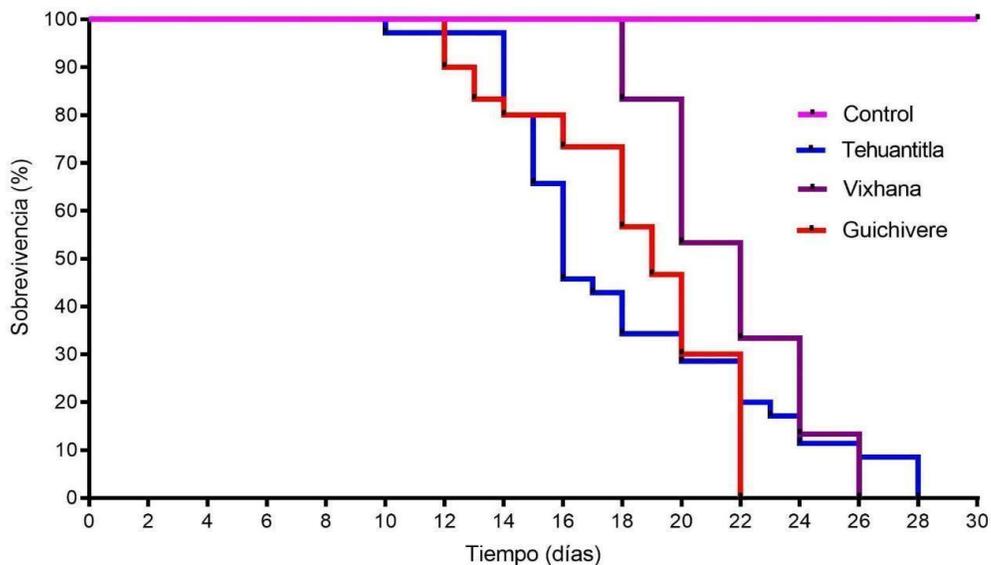
En los tres aislados analizados, el período prepatente o la presencia de tripomastigotes sanguíneos fue en el día 2 posterior a la inoculación. El aislado de la localidad Tehuantitla presentó un pico de parasitemia de  $2.3 \times 10^7$  parásitos/mL en el día 22 post inoculación. Los aislados Vixhana  $1.7 \times 10^7$  parásitos/mL en el día 24 y Guichivere  $1.2 \times 10^7$  parásitos/mL en el día 18, siendo este último el que presentó la menor parasitemia. Se encontraron diferencias significativas entre Vixhana y Guichivere ( $p=0.028$ ) y entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.002$ ) en el día 14. En el día 20 se encontraron diferencias significativas entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.016$ ). En el día 22 también se encontraron diferencias significativas en los valores de parasitemia entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.028$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Parasitemia en ratones (n=32) CD-1 infectados con los aislados de Tehuantitla, Vixhana y Guichivere durante 30 días posteriores a la infección.

## 9.2 Curvas de supervivencia

La supervivencia de los ratones infectados con tripomastigotes sanguíneos en los días 22, 26 y 28 post-infección fue del 0% en los tres aislados Guichivere, Vixhana y Tehuantitla, respectivamente, mientras que el grupo control presentó un 100% de supervivencia hasta el día 30. Se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia entre los tres aislados (Log-Rank, Mantel-Cox,  $\chi^2=92.32$ ,  $<0.001$ ). En las comparaciones pareadas entre el control, con los tres aislados, en todas las comparaciones existieron diferencias altamente significativas ( $p<0.001$ , en todos los casos). Sin embargo, al comparar de forma pareada la supervivencia entre los tres aislados, en ninguna se observan diferencias significativas ( $p>0.05$  en todos los casos). El tiempo de supervivencia media de los aislados fue de 16, 22 y 19 días, para Tehuantitla, Vixhana y Guichivere respectivamente (Figura 20).



**Figura 20.** Supervivencia de ratones CD-1 infectados con los aislados Tehuantitla, Guichivere, Vixhana ( $n=32$ ) y el grupo control ( $n=16$ ), durante 30 días posterior a la infección.

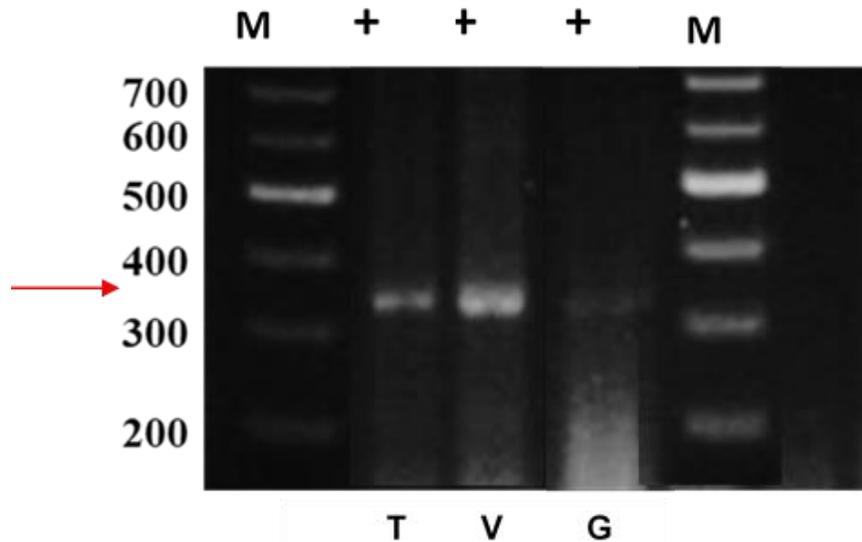
Las comparaciones de los parámetros analizados para la caracterización biológica de los tres aislados se muestran de manera concreta en la tabla 11.

**Tabla 11.** Parámetros de parasitemia y sobrevivencia en los tres casos aislados de estudio.

Aislado	Sobrevivencia	Sobrevivencia media (Días)	Parasitemia máxima promedio	Observaciones
<b>Tehuantitla</b> (ITRI/MX/17/ TEHUANTITLA)	0% Día 28	16	2.3X10 <sup>7</sup> Día 22	Parálisis en los cuartos traseros, pelo erizado
<b>Vixhana</b> (ITRI/MX/17/ VIXHANA-M)	0% Día 26	20	1.7X10 <sup>7</sup> Día 24	Parálisis en los cuartos traseros, pelo erizado, Ptosis palpebral
<b>Guichivere</b> (ITRI/MX/17/ GUICHIVERE-H)	0% Día 22	19	1.2X10 <sup>7</sup> Día 18	Parálisis en los cuartos traseros, pelo erizado

### 9.3 Identificación filogenética de *T. cruzi*

En cuanto a la genotipificación de *T. cruzi* por la amplificación de la región intergénica del gen mini exón, se observó una banda de 350 pb (Figura 24) en las muestras provenientes de los tres aislados, lo cual corresponde a la identificación de *T. cruzi* I.



**Figura 24.** Amplificación por PCR de la región intergénica del gen mini-exón para los aislados del vector *Meccus phyllosomus*. **M:** Marcador molecular escalera de 100 pb, **T:** aislado de Tehuantitla; **V:** aislado de Vixhana; **G:** Aislado Guichivere.

#### 9.4 Cuantificación de RNA y DNA

Para evaluar la calidad del RNA y DNA extraído se determinó la concentración y la relación de absorbancias A260/A280.

##### 9.4.1 Calidad y pureza del RNA

En las tablas 12,13,14 y 15 se observa la cuantificación de ácidos nucleicos (RNA total antes de la transcripción inversa) en corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro de los tres aislados y el grupo control.

Se obtuvieron valores para la relación de absorbancia A260/280 entre 1.8 y 2.1 para los tres aislados en los 4 días analizados, mientras que en la relación de absorbancia A260/230 la mayoría de los resultados se encuentran entre 1.8 y 2.2,

siendo los valores de esófago los que salen de este rango como se muestran en las tablas.

**Tabla 1.** Valores de cuantificación de RNA del aislado Tehuantitla

	Órgano	RNA µg/mL	A260/A280	A260/A230
Día 14	Corazón	1038	1.958	2.257
	Corazón	396	1.922	2.386
	Esófago	106	1.839	2.789
	Esófago	146	1.825	2.517
	Gastrocnemio	200	1.852	2.439
	Gastrocnemio	818	1.911	2.272
	Cerebro	856	1.937	2.326
	Cerebro	488	1.906	2.369
Día 18	Corazón	192	1.882	2.526
	Corazón	460	1.933	2.396
	Esófago	194	1.865	2.205
	Esófago	338	1.878	2.449
	Gastrocnemio	976	1.921	2.291
	Gastrocnemio	250	1.838	2.551
	Cerebro	1012	1.931	2.343
	Cerebro	584	1.908	2.347
Día 20	Corazón	506	1.833	2.410
	Corazón	360	1.895	2.432
	Esófago	130	1.857	2.241
	Esófago	90	1.800	1.607
	Gastrocnemio	464	1.856	2.343
	Gastrocnemio	210	1.842	2.386
	Cerebro	610	1.894	2.402
	Cerebro	328	1.885	2.603
Día 22	Corazón	1088	1.943	2.386
	Corazón	462	1.909	2.406
	Esófago	246	1.864	2.406
	Esófago	204	1.855	2.267
	Gastrocnemio	658	1.902	2.333
	Gastrocnemio	350	1.862	2.431
	Cerebro	562	1.861	2.381
	Cerebro	1322	1.950	2.279

**Tabla 2.** Valores de cuantificación de RNA del aislado Vixhana

	Órgano	RNA µg/mL	A260/A280	A260/A230
Día 14	Corazón	806	2.005	2.132
	Corazón	748	1.958	2.89
	Esófago	108	1.862	2.00
	Esófago	198	1.980	1.053
	Gastrocnemio	598	1.904	2.121
	Gastrocnemio	614	1.919	1.968
	Cerebro	194	1.902	2.205
	Cerebro	156	1.950	2.294
	Corazón	268	1.942	2.271
	Corazón	1434	1.997	2.213
Día 18	Esófago	42	2.100	0.700
	Esófago	402	2.116	1.500
	Gastrocnemio	1114	1.961	2.176
	Gastrocnemio	1028	1.979	1.911
	Cerebro	410	1.971	2.303
	Cerebro	1014	1.973	2.305
	Corazón	1312	1.976	2.239
	Corazón	844	1.963	2.269
	Esófago	114	1.900	1.239
	Esófago	292	2.116	1.390
Día 20	Gastrocnemio	360	1.915	2.195
	Gastrocnemio	136	1.943	1.859
	Cerebro	1322	1.979	2.287
	Cerebro	658	1.970	2.056
	Corazón	498	1.930	2.284
	Corazón	414	1.953	2.250
	Esófago	132	2.062	0.985
	Esófago	152	2.111	1.000
	Gastrocnemio	372	1.918	2.138
	Gastrocnemio	176	1.872	2.316
Día 22	Cerebro	184	1.917	2.629
	Cerebro	1246	1.965	2.325

**Tabla 3.** Valores de cuantificación de RNA del aislado Guichivere

	Órgano	RNA µg/mL	A260/A280	A260/A230
Día 14	Corazón	582	1.993	2.205
	Corazón	250	2.016	2.500
	Esófago	144	1.846	2.118
	Esófago	144	1.846	2.250
	Gastrocnemio	170	1.889	2.297
	Gastrocnemio	558	1.951	2.306
	Cerebro	396	1.960	2.276
	Cerebro	918	2.017	2.318
Día 18	Corazón	234	1.950	2.388
	Corazón	266	1.956	2.375
	Esófago	94	1.880	2.043
	Esófago	294	1.885	2.297
	Gastrocnemio	290	1.959	2.302
	Gastrocnemio	196	1.960	2.513
	Cerebro	516	1.985	2.389
	Cerebro	270	1.985	2.368
Día 20	Corazón	850	1.995	2.104
	Corazón	460	1.949	2.190
	Esófago	238	1.859	2.333
	Esófago	112	1.931	1.867
	Gastrocnemio	300	1.923	2.381
	Gastrocnemio	212	1.893	2.208
	Cerebro	942	1.971	2.403
	Cerebro	302	1.936	2.517
Día 22	Corazón	336	1.909	2.400
	Corazón	674	1.959	2.390
	Esófago	142	1.868	2.536
	Esófago	34	1.889	3.400
	Gastrocnemio	80	1.905	1.881
	Gastrocnemio	26	1.857	3.250
	Cerebro	254	1.924	2.442
	Cerebro	465	1.966	3.327

**Tabla 4.** Valores de cuantificación de RNA del grupo control

	<b>Órgano</b>	<b>RNA µg/mL</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
Día 14	Corazón	670	1.994	2.310
	Esófago	58	1.812	1.318
	Gastocnemio	32	1.778	0.889
	Cerebro	1734	2.02	2.252
Día 18	Corazón	522	2.008	2.270
	Esófago	84	1.909	1.500
	Gastocnemio	360	1.935	2.278
	Cerebro	1050	1.989	2.313
Día 18	Corazón	742	2.005	2.290
	Esófago	174	1.891	2.122
	Gastocnemio	300	1.923	2.308
	Cerebro	1064	1.985	2.163
Día 22	Corazón	258	2.01	2.263
	Esófago	138	1.917	1.816
	Gastocnemio	256	1.910	2.169
	Cerebro	1936	2.000	2.220

#### 1.1.1 Calidad y pureza del DNA (cDNA)

En las tablas 16,17,18 y 19 se observa la cuantificación de ácidos nucleicos (cDNA posterior a la transcripción inversa) en corazón, esófago, gastocnemio y cerebro de los tres aislados y el grupo control.

La cuantificación de cDNA en corazón, esófago, gastocnemio y cerebro de los tres aislados y el grupo control para la relación A260/A280 fueron superiores a 1.7, mientras que para la relación A260/A230 fueron superiores a 2 en todos los casos, mostrando que se obtuvo un DNA de pureza óptima durante la extracción de RNA.

**Tabla 5.** Valores de cuantificación de cDNA del aislado Tehuantitla.

	Órgano	cDNA µg/mL	A260/A280	A260/A230
Día 14	Corazón	2396.3	1.77	2.31
	Corazón	2637.6	1.76	2.27
	Esófago	1310.3	1.78	2.34
	Esófago	1579.3	1.78	2.34
	Gastrocnemio	1342.9	1.78	2.35
	Gastrocnemio	1449.1	1.78	2.35
	Cerebro	1959.0	1.77	2.31
	Cerebro	1473.1	1.78	2.33
Día 18	Corazón	2465.8	1.76	2.32
	Corazón	1432.9	1.77	2.32
	Esófago	1415.9	1.78	2.27
	Esófago	1581.5	1.79	2.32
	Gastrocnemio	1562.0	1.78	2.34
	Gastrocnemio	1551.3	1.78	2.35
	Cerebro	1696.2	1.77	2.33
	Cerebro	1423.5	1.78	2.32
Día 20	Corazón	1723.3	1.77	2.34
	Corazón	1491.6	1.77	2.32
	Esófago	2614.9	1.74	2.25
	Esófago	1470.5	1.76	2.16
	Gastrocnemio	1756.8	1.76	2.26
	Gastrocnemio	1870.4	1.77	2.31
	Cerebro	1620.5	1.78	2.32
	Cerebro	2900.0	1.74	2.28
Día 22	Corazón	2014.7	1.77	2.31
	Corazón	1821.1	1.77	2.31
	Esófago	2435.8	1.75	2.30
	Esófago	1491.2	1.78	2.27
	Gastrocnemio	1451.8	1.78	2.32
	Gastrocnemio	1501.7	1.78	2.32
	Cerebro	1358.4	1.77	2.30
	Cerebro	1513.2	1.80	2.31

**Tabla 6.** Valores de cuantificación de cDNA del aislado Vixhana.

	<b>Órgano</b>	<b>cDNA µg/mL</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
Día 14	Corazón	4227.9	1.70	2.19
	Corazón	3131.8	1.75	2.29
	Esófago	1544.9	1.77	2.32
	Esófago	1851.8	1.76	2.27
	Gastrocnemio	1781.4	1.78	2.35
	Gastrocnemio	3049.4	1.75	2.31
	Cerebro	3112.3	1.75	2.31
	Cerebro	2068.4	1.78	2.33
Día 18	Corazón	4720.2	1.64	2.10
	Corazón	3241.0	1.75	2.29
	Esófago	1059.9	1.77	1.89
	Esófago	2520.0	1.75	2.30
	Gastrocnemio	2310.8	1.76	2.34
	Gastrocnemio	1908.2	1.77	2.31
	Cerebro	3711.0	1.71	2.25
	Cerebro	2216.4	1.77	2.33
Día 20	Corazón	2418.0	1.78	2.36
	Corazón	1883.6	1.78	2.35
	Esófago	1814.9	1.76	2.33
	Esófago	1073.4	1.71	2.24
	Gastrocnemio	1853.0	1.77	2.33
	Gastrocnemio	1751.9	1.75	2.25
	Cerebro	3320.1	1.75	2.28
	Cerebro	4072.8	1.71	2.21
Día 22	Corazón	5648.6	1.06	2.28
	Corazón	3568.9	1.74	2.25
	Esófago	2387.3	1.76	2.18
	Esófago	2721.8	1.74	2.14
	Gastrocnemio	2272.5	1.77	2.33
	Gastrocnemio	2093.8	1.77	2.33
	Cerebro	2839.2	1.76	2.31
	Cerebro	3785.4	1.73	2.24

**Tabla 7.** Valores de cuantificación de cDNA del aislado Guichivere.

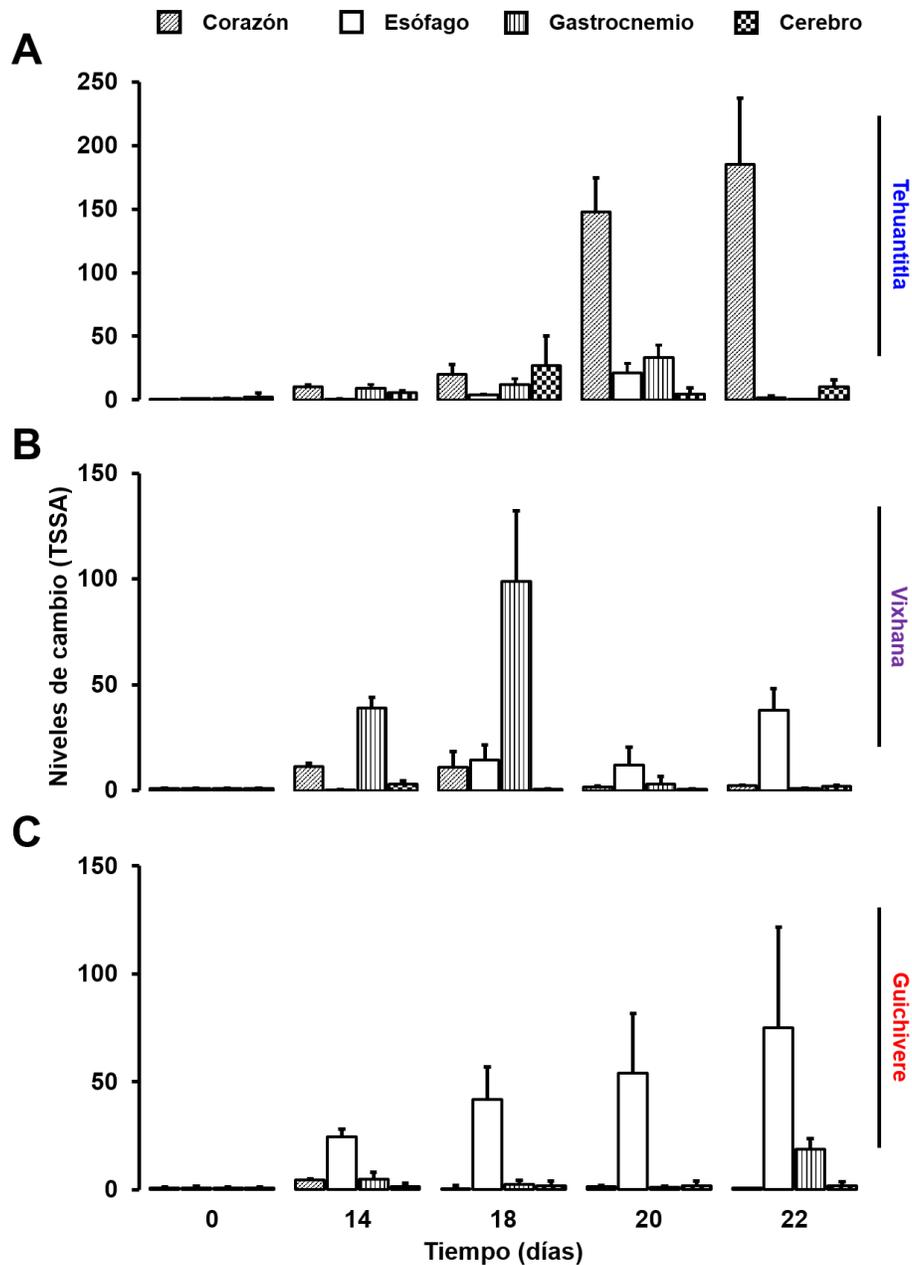
	Órgano	cDNA µg/mL	A260/A280	A260/A230
Día 14	Corazón	1812.0	1.78	2.34
	Corazón	2059.3	1.78	2.35
	Esófago	1801.6	1.78	2.34
	Esófago	1849.3	1.79	2.36
	Gastrocnemio	1732.6	1.78	2.35
	Gastrocnemio	2683.3	1.77	2.34
	Cerebro	2068.6	1.78	2.34
	Cerebro	2000.6	1.78	2.35
Día 18	Corazón	1988.1	1.78	2.36
	Corazón	2610.8	1.78	2.33
	Esófago	1428.1	1.79	2.37
	Esófago	2015.9	1.78	2.35
	Gastrocnemio	2120.0	1.78	2.35
	Gastrocnemio	1846.4	1.78	2.36
	Cerebro	1978.1	1.78	2.36
	Cerebro	1890.1	1.78	2.36
Día 20	Corazón	2011.0	1.78	2.33
	Corazón	2009.9	1.78	2.36
	Esófago	2793.9	1.76	2.32
	Esófago	2467.0	1.77	2.32
	Gastrocnemio	2880.1	1.77	2.31
	Gastrocnemio	1843.4	1.77	2.33
	Cerebro	1992.8	1.78	2.35
	Cerebro	2135.1	1.78	2.34
Día 22	Corazón	2458.9	1.76	2.34
	Corazón	1953.4	1.79	2.36
	Esófago	2016.9	1.77	2.34
	Esófago	922.6	1.79	2.32
	Gastrocnemio	822.2	1.80	2.28
	Gastrocnemio	543.1	1.75	2.32
	Cerebro	2548.5	1.78	2.34
	Cerebro	1432.6	1.80	2.35

**Tabla 8.** Valores de cuantificación de cDNA del grupo control.

	<b>Órgano</b>	<b>cDNA µg/mL</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
Día 14	Corazón	3015.3	1.76	2.30
	Esófago	936.5	1.80	2.29
	Gastrocnemio	1025.7	1.78	2.23
	Cerebro	1922.1	1.78	2.33
Día 18	Corazón	3060.5	1.76	2.29
	Esófago	1340.4	1.78	2.26
	Gastrocnemio	1489.4	1.80	2.33
	Cerebro	1949.2	1.79	2.35
Día 18	Corazón	4831	1.65	2.12
	Esófago	2255.3	1.78	2.33
	Gastrocnemio	3602.3	1.75	2.27
	Cerebro	2416.7	1.85	2.18
Día 22	Corazón	2107.8	1.79	2.36
	Esófago	2656.1	1.78	2.32
	Gastrocnemio	2181	1.79	2.23
	Cerebro	2617.6	1.78	2.31

### 9.5 Expresión del gen tssa de *T. cruzi*

Las gráficas obtenidas (Figura 25) nos muestran que para el aislado de Tehuantitla el nivel más elevado de la expresión relativa del gen TSSA se presentó en corazón al día 20 y 22 posterior a la inoculación. Los niveles más altos de TSSA para Vixhana se obtuvieron en gastrocnemio al día 22 después de la inoculación. Para el aislado de Guichivere hay una mayor expresión en el esófago el día 22.



**Figura 25.** Niveles de expresión relativa del gen *tssa* en diferentes tejidos de ratones infectados con aislados de *T. cruzi* de distintas localidades de Oaxaca. El análisis de qPCR se realizó con RNA total de corazón, esófago, gastrocnemio y cerebro de ratones sanos (tiempo 0) e infectados (14, 18, 20 y 22 días post infección) con aislados de Tehuantitla (A), Vixhana (B), o Guichivere (C). Los datos obtenidos del transcrito de *tssa* se normalizaron contra el nivel de expresión del gen  $\beta$ -actina

(Actb). Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de al menos dos réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas (n= 8).

Los datos que se muestran son los valores del promedio y error estándar de al menos dos réplicas biológicas independientes, donde cada réplica biológica implica cuatro réplicas técnicas (total n= 8).

## 10 Discusión

El estudio de aislados provenientes de *M. phyllosomus* permite comprender aspectos de la biología del parásito y del comportamiento de los aislados obtenidos del vector triatomino.

A pesar de la importancia de la enfermedad en el estado de Oaxaca, es poco lo que se ha reportado sobre la biología del vector *M. phyllosomus* y la virulencia de los aislados obtenidos de éste. En este trabajo se obtuvieron aislados de *T. cruzi* provenientes de *M. phyllosomus*, para realizar su caracterización biológica y molecular. Los aislados fueron obtenidos a partir de deyecciones de triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi* y colectados en tres comunidades del Estado de Oaxaca, que es una región altamente endémica de la infección por *T. cruzi* y de la enfermedad de Chagas en México (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

El comportamiento biológico de los tres aislados provenientes del vector *M. phyllosomus*, mostró niveles de parasitemia diferentes entre ellos en el modelo murino CD-1 inoculados por vía intraperitoneal. Las parasitemias iniciales se presentaron al día 2 post inoculación para los tres aislados.

El aislado Tehuantitla presentó la parasitemia más alta post-inoculación de  $2.3 \times 10^7$  parásitos/mL en el día 22, seguido del aislado Vixhana que presentó  $1.7 \times 10^7$  parásitos/mL el día 24 y Guichivere, el cual presenta la parasitemia más baja con  $1.2 \times 10^7$  parásitos/mL el día 22. En el día 14, se encontraron diferencias significativas entre Vixhana y Guichivere ( $p=0.028$ ) y entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.002$ ). Se encontraron diferencias significativas entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.016$ ) en el día 20 y también se encontraron diferencias significativas entre Tehuantitla y Guichivere ( $p=0.028$ ) en el día 22.

Existen otros aislados provenientes de diferentes vectores que de igual manera han sido evaluados en modelo murino CD-1 y presentan diferentes grados de parasitemia, como es el caso del aislado TQ proveniente del vector *M. pallidipennis* (Tequesquitengo, Morelos), el cual presentó una parasitemia máxima de  $44 \times 10^6$

parásitos/mL el día 13 post-inoculación. El aislado Qro proveniente del vector *T. barberi* (La cueva, Querétaro) con una parasitemia máxima de  $21 \times 10^6$  parásitos/mL el día 6 post-inoculación y el aislado Xal-615 proveniente del vector *T. dimidiata* (Xalapa, Veracruz) con una parasitemia de  $12 \times 10^6$  parásitos/mL el día 12 (Aguilar-Díaz, 2004).

Se han estudiado aislados provenientes de vectores del género *Meccus* (*M. pallidipennis*, *M. longipennis* y *M. picturata*) de Jalisco, México, de los cuales reportaron valores de parasitemia máxima de  $4.6 \times 10^6$  parásitos/mL y  $10^7$  parásitos/mL (Gómez-Hernández *et al.*, 1999).

También, como parte de la caracterización biológica, se evaluó la sobrevivencia, que se define como el número de ratones que persisten al final del experimento, que para este caso fueron 30 días post-infección, obteniendo un 0% de sobrevivencia en los grupos de ratones infectados para los tres aislados en los días 28, 26 y 22 para Tehuantitla, Vixhana y Guichivere respectivamente, lo que nos indica que los tres aislados causan baja sobrevivencia en nuestra población de estudio en un periodo no mayor de 30 días.

Otro parámetro evaluado en este trabajo fue la sobrevivencia media, siendo el día en el cual se presenta el 50% de mortalidad en los ratones de estudio. El aislado de Tehuantitla presentó una sobrevivencia media el día 16, Vixhana el día 22 y Guichivere el día 19.

En 2015 Mendoza-Rodriguez al realizar la caracterización biológica de cepas mexicanas provenientes de *Meccus pallidipennis* obtiene que para el aislado Morelos hay una sobrevivencia de 0% en el día 59 pi (Mendoza-Rodriguez, 2015) Con estos datos podemos observar que los tres casos aislados de estudio son mortales en un periodo de menor tiempo.

Estos resultados muestran que el aislado Tehuantitla proveniente del vector *M. phyllosomus* fue la cepa con mayor parasitemia, sin embargo, la sobrevivencia más

baja en el menor tiempo fue la del aislado Guichivere, el cual obtuvo el 0% de sobrevivencia el día 22.

Los resultados de genotipificación mostraron que los aislados provenientes de *M. phyllosomus* corresponden al genotipo TcI, ya que se obtuvo un producto de amplificación de 350 pb con los oligonucleótidos para el gen mini-exón.

El linaje más reportado en México es el TcI, que se ha encontrado en humanos, en diversos mamíferos y en aislados provenientes de varias especies de triatomíneos infectados. Se han realizado otros estudios por Pérez España y colaboradores en el estado de Hidalgo, por medio de la técnica molecular de PCR multiplex que amplifica el gen mini-exón, se encontró el linaje TcI en tres especies de insectos vectores; *T. dimidiata*, *T. mexicana* y *T. gerstaeckeri*. (Pérez España *et al.*, 2019)

Es importante realizar la genotipificación de los aislados ya que, en Oaxaca, así como en el resto del país se ha reportado la presencia de *T. cruzi* TcI como el único linaje presente en esta zona (Bosseno, Espinoza *et al.* 2000, Barnabe *et al.* 2009).

Sin embargo, en los últimos años se ha identificado la presencia de otras cinco DTUs (TcII-TcVI), las cuales han sido determinadas en muestras de mamíferos y de triatomíneos (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013)

La enfermedad de Chagas se considera un problema de salud pública en muchos países por la gran cantidad de personas afectadas y la variedad de manifestaciones clínicas con que se presenta. Muchos estudios han llevado a pensar que dicha variación está ligada directamente al genotipo de los parásitos circulantes, ya que diferencias genéticas en las poblaciones del parásito hacen que estos presenten un tropismo diferencial por tejidos del hospedero durante la fase crónica de la enfermedad (Andrade *et al.*, 1999)

En el caso de los linajes TcII-TcVI existen pocos estudios en México, y en éstos se ha reportado la presencia de los diferentes linajes de *T. cruzi* en heces de varias especies de vectores provenientes del estado de Michoacán. De enero a noviembre del 2009, Ibáñez y colaboradores recolectaron 100 ejemplares adultos machos y

hembras de *Meccus pallidipennis*, *M. longipennis* y *Triatoma barberi*. El 20 % de los aislados fueron tipificados como TcIV, el 46,66 % como TcI, el 13,33 % como TcII y el 6,66 % como Tc III (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013).

Estudios previos han sugerido que TcI es el linaje más relacionado con cardiomiopatía y TcII con TcVI se encuentran más relacionados con síndromes digestivos (megaesófago/megacolon) (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013).

En los ratones infectados con el aislado de Tehuantitla, se detectó la expresión del gen *tssa* principalmente en corazón, gastrocnemio y cerebro en los días 20 y 22 post infección (Figura 25A).

En la infección con el aislado de Vixhana se detectó que la expresión del gen *tssa* nos indica un tropismo diferencial en el gastrocnemio el día 18 post infección (Figura 25B).

En este trabajo podemos ver que el aislado Guichivere a pesar de ser identificado como TcI, presenta un tropismo claramente marcado en el esófago, presentando un incremento paulatino en la expresión del gen *tssa* desde el día 14 hasta el día 22 post infección (Figura 25C).

Es importante resaltar que la infección con el aislado de Tehuantitla presenta la mayor parasitemia (Figura 19) y expresión del gen *tssa* en corazón, gastrocnemio y cerebro (Figura 25A), por lo que se considera el aislado más virulento.

La técnica de qPCR puede utilizarse como una técnica de rutina en la detección de parásitos en muestras de sangre. Las ventajas de este ensayo son su alta sensibilidad y especificidad de los oligonucleotidos para *T. cruzi*. Ofrece un riesgo reducido de falsos positivos para identificar correctamente el parásito.

## 11 Conclusiones

- El comportamiento biológico en los tres aislados fue diferente aun cuando provenían de la misma especie de triatomo, *Meccus phyllosomus*. Se esperaba que aislados provenientes de éste vector presenten un mismo comportamiento al descrito en este trabajo.
- El aislado Tehuantitla presentó la parasitemia más alta de  $2.3 \times 10^7$  parásitos/mL post-inoculación. Se presentaron diferencias significativas entre los tres aislados en los días 14, 20 y 22.
- Los tres aislados presentaron un 0% de sobrevivencia el día 28 para Tehuantitla, 26 para Vixhana y 22 para Guichivere. En el grupo control se presentó un 100% de sobrevivencia a los 30 días post inoculación (solución salina isotónica). Se presentaron diferencias significativas entre los tres aislados con respecto al grupo control. No obstante, el tiempo de sobrevivencia media fue menor en el aislado de Tehuantitla en el día 16, en comparación con Vixhana el día 22 y Guichivere el día 19.
- Los resultados de genotipificación mostraron que los aislados de *Meccus phyllosomus* corresponden a poblaciones de Tc1, caracterizados por una banda de amplificación de 350 pares de base para el gen mini exón, principalmente distribuido en Sudamérica, Centroamérica y México. Estos aislados están asociados predominantemente con casos de cardiomiopatía y mayor resistencia al benznidazol que otros grupos genéticos.

- Los aislados de Tehuantitla, Vixhana y Guichivere muestran diferente tropismo tisular, Tehuantitla con predominio en corazón y cerebro, Vixhana en el gastrocnemio y Guichivere en el esófago. No se han reportado estudios previos sobre el comportamiento de estos aislados y que además correlacionen la parasitemia con niveles de expresión del gen tssa en diferentes órganos.
- El aislado Tehuantitla fue el que presentó mayor grado de virulencia al considerar la parasitemia, la sobrevivencia y el tropismo (expresión del gen tssa).

## 12 Bibliografía

- Aguilar-Díaz, J. H. (2004). *Caracterización biológica e inmunoquímica de cuatro aislados de Trypanosoma cruzi*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México.
- Álvarez-Hernández, D.-A., Franyuti-Kelly, G.-A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A.-M., González-Hermosillo-Cornejo, D., & Vázquez-López, R. (2018). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 81(3), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>
- Andrade, L. O., Machado, C. R. S., Chiari, E., Pena, S. D. J., & Macedo, A. M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 100(2), 163–172. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)90035-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)90035-X)
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- Bestetti, R. B., Ramos, C. P., Godoy, R. A., Oliveira, J. S., Bern, C., Martin, D. L., Gilman, R. H., & A. Prata. (1987). Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet infection disease. Advances in Parasitology*, 1(5), 344–351. <https://doi.org/10.1159/000174221>
- Botero, L. A., Mejica, A. M., & Triana Chávez, O. (2007). Biological and genetic characterization of two Colombian clones of *Trypanosoma cruzi* groups I and II. *Biomedica*, 27(SUPPL. 1), 64–74. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.249>
- Brutus, L., Castillo, H., Bernal, C., Salas, N. A., Schneider, D., Santalla, J. A., & Chippaux, J. P. (2010). Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), 1044–1047. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0326>

- Cabello. (2008). Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Revista Medica de Chile*, 136(3), 385–393. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872008000300016>
- Carabarin-Lima, A., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-López, P. A., & Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*, 127(2), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.007>
- Cassab et al. (1999). *La enfermedad de chagas en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002)*. PG-259-259, 259. NS -
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. (2019). CDC - DPDx - American Trypanosomiasis. In *Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria* (p. 2). [https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html?fbclid=IwAR3Z7\\_NClwU5owGvsrShvX3jwQeRQPdTh4JHeKEHic4OXe-70nb91XrPJ70](https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html?fbclid=IwAR3Z7_NClwU5owGvsrShvX3jwQeRQPdTh4JHeKEHic4OXe-70nb91XrPJ70)
- Consultation, W. H. O. I., & Office, W. H. O. R. (2009). Control and prevention of Chagas disease in Europe. *WHO*, December. [http://www.who.int/chagas/resources/who\\_htm\\_ntd\\_idm\\_2010.1/en/](http://www.who.int/chagas/resources/who_htm_ntd_idm_2010.1/en/)
- Cortés, J. M., Velasco Castrejón, O., Labastida, M. H., Melchor, A. H., Duarte, N., & de Torre, R. (1985). La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. *Salud Publica de Mexico*, 27(1), 60–65.
- De Fuentes-Vicente et al. (2020). Kissing Bugs (Triatominae). In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818731-9.00010-0>
- De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Flores-Villegas, A. L., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M. C., Salazar-Schettino, P. M., Rodríguez-López, M. H., & Gutiérrez-Cabrera, A. E. (2019). Trypanosoma cruzi: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Tropica*, 195(April), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.024>

- de Oliveira, Ê. C., da Silveira, A. B. M., & Luquetti, A. O. (2019). Gastrointestinal Chagas Disease. In *Birkhauser Advances in Infectious Diseases* (pp. 243–264). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7_12)
- De Souza et al. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C., & Frasch, A. C. C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.20011433>
- Díaz, L., Covarrubias, K., Licón, Á., Astorga, M., Moreno, Y., & Martínez, J. A. (2017a). Biological parameters of *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister), 1835, *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera, Reduviidae) and their laboratory hybrids. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 37(Agust), 77–82. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3444>
- Díaz, L., Covarrubias, K., Licón, Á., Astorga, M., Moreno, Y., & Martínez, J. A. (2017b). Biological parameters of *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister), 1835, *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera, Reduviidae) and their laboratory hybrids. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 37(2), 77–82. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3444>
- Favila-Ruiz, G., Jiménez-Cortés, J. G., Córdoba-Aguilar, A., Salazar-Schettino, P. M., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Pérez-Torres, A., De Fuentes-Vicente, J. A., Vences-Blanco, M. O., Bucio-Torres, M. I., Flores-Villegas, A. L., & Cabrera-Bravo, M. (2018). Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3016-0>
- Ferrer, E. (2015). Artículo de Revisión Biomedicina. Técnicas Moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Universidad de Oriente, Venezuela*,

27(3), 359–371.

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Prat, J. G., Herrera, R. N., Lafuente, C. A., Luciardi, H. L., Moncayo, Á., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., & Sergio-Salles, X. (2008). Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(2), 99–106. <https://doi.org/10.1157/13115545>

Genta, F. A., Diaz-Albiter, H. M., Salgueiro, P., & Gomes, B. (2016). Control of vector-borne human parasitic diseases. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1014805>

Goldsmith, R. S., Kagan, I. G., Zarate, R., Reyes-González, M. A., & Cedeño-Ferreira, J. (1978). Epidemiologic studies of Chagas' disease in Oaxaca, Mexico. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 12(3), 236–250.

Gómez-hernández, C., Rezende-oliveira, K., Antônio, G., Nascentes, N., Batista, L. R., Kappel, H. B., Martinez-ibarra, J. A., Contreras, F. T., Lages-silva, E., & Ramírez, L. E. (1999). *Molecular characterization of Trypanosoma cruzi Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model* *Caracterização molecular de cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi e seu comportamento no modelo experimental do camundongo*. 44(6), 1–7.

González García, M., San Juan Galán, J., Morales Vicente, F. E., & Otero González, A. (2017). Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. *Péptidos Antimicrobianos: Potencialidades Terapéuticas*, 69(2), 01–13.

Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma cruzi* genome: Organization, multi-gene families, transcription, and biological implications. *Genes*, 11(10), 1–26. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>

Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C., Maldonado, T., Hernández, J. M., & León-Avila, G. (2013). Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and

determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitology International*, 62(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.003>

Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography*, 49(6), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>

Liu et al. (2015). Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infectious Diseases of Poverty*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40249-015-0092-7>

López-Ordoñez;acute, T., Panzera, F., Ezequiel Tun-Ku, B., Ferrandis, I., & Ramsey, J. M. (2009). Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. *Salud Publica de Mexico*, 51(SUPPL.3). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900007>

Maria, P., Schettino, S., Arteaga, I. D. H., Gar, Y., Qtiiroz, M. G., & Iroduccion, N. (1940). *EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN UNA POBLACION DE OAXACA, MEXICOI*. 20(4).

María Salazar-Schettino, P., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Citlalli De Alba-Alvarado, M., Rocío Castillo-Saldaña, D., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Angélica Fernández-Santos, N., & Perera-Salazar, G. (2016). *Enfermedad de Chagas en México*.

Mario, J., Díaz, P., Katherine, L., Rey, P., Esther, K., Castillo, R., Pahola, V., & Rojas, R. (2014). Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia Revisión de Tema Infectología Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. *Carrera Ed. Monviso. Portón Del Tejar. Bucaramanga. Santander*, 33(1), 91–52.

Martínez-Ibarra et al. (2017a). Comparison of biological fitness in crosses between subspecies of *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in southern Mexico. *Insect Science*, 24(1), 114–121. <https://doi.org/10.1111/1744->

7917.12246

- Martínez-Ibarra, J. A., Alejandre-Aguilar, R., Torres-Morales, A., Trujillo-García, J. C., Noguera-Torres, B., & Trujillo-Contreras, F. (2006). Biology of three species of the *Meccus phyllosomus* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on blood of hens and rabbits. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *101*(7), 787–794. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700014>
- Martínez-Ibarra, J. A., Noguera-Torres, B., Salazar-Montaña, L. F., García-Lino, J. C., Arroyo-Reyes, D., & Hernández-Navarro, J. Á. (2017b). Comparison of biological fitness in crosses between subspecies of *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in southern Mexico. *Insect Science*, *24*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12246>
- Molina et al. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *34*(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- Monteón, V. M., Reyes-López, P. A., Sosa-Palacio, A., León-Tello, G., Martínez-Murguía, J., & Sosa-Jurado, F. (2005). Distribución heterogénea de la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en Puebla, México. TT - [Heterogeneous distribution of the prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors in the State of Puebla. *Salud Pública Mex*, *47*(2), 116–125. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0036-36342005000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0036-36342005000200005%0Ahttp://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0036-36342005000200005)
- Morales-Moran, S., Sánchez-García, E., Chávez-Gómez, R. I., Carrasco-Esparza, N. A., Aguayo-Acosta, A., & Hernández-Marín, D. A. (2021). Distribution of *Triatoma* (*Meccus*) *phyllosoma* and *Triatoma* (*Meccus*) *longipennis* as vectors of *Trypanosoma cruzi* in the state of Aguascalientes, Mexico and surroundings. *Alianzas y Tendencias BUAP*, *6*(22), 1–15.

<https://drive.google.com/file/d/1VqtU2uWkLtKwdIBWiD7NjhfWxX6QuSoy/view>

Mordini, O. D., Bavio, E., Beloscar, J., Tognoni, G., Sosa, F. J., Pairone, E., Lacunza, D., Manzur, R., Redondo, M., & Hernández, D. (2016). Enfermedad de Chagas en Mexico. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 45(2), 84–92.

Moreno López, R. M., Sánchez Paredes, L., Muñoz Jiménez, L., Monteón, V. M., & Reyes López, P. A. (2001). Cardiopatía chagásica en Tehuantepec. Informe preliminar. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 71(1), 43–49.

Mogabure-Cueto et al. (2015). Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica*, 149, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.014>

Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL.1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)

OMS. (2011). *Organización Mundial de la Salud*. [Wwwwwho.int. https://www.who.int/es](http://www.who.int/es)

OPS. (2018). *Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Washington, D.C. OPS; 2018.

OPS. (2020). OPS/OMS | Información general: Enfermedad de Chagas. Organización Panamericana de La Salud. [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es)

Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., De Fuentes-Vicente, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25, 1–19. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.449>

Pérez España, V. H., Morales Evangelista, C. L., Vázquez Chagoyán, J. C.,

- Valladares Carranza, B., Romero Cortes, T., Cuervo Parra, J. A., Martínez Hernández, I., Noguez García, J. C., & Aparicio Burgos, J. E. (2019). Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatomíneos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México. *Nova Scientia*, 11(22), 171–185. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i22.1759>
- Ramsey, J. M., Ordoñez, R., Cruz-Celis, A., Alvear, A. L., Chavez, V., Lopez, R., Pintor, J. R., Gama, F., & Carrillo, S. (2000). Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas Disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1), 19–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00214.x>
- Rassi et al. (2010). Chagas disease. In *The Lancet* (Vol. 375, Issue 9723, pp. 1388–1402). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Risso, M. G., Garbarino, G. B., Mocetti, E., Campetella, O., González Cappa, S. M., Buscaglia, C. A., & Leguizamon, M. S. (2004). Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *Journal of Infectious Diseases*, 189(12), 2250–2259. <https://doi.org/10.1086/420831>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M. I., Martínez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M. O., Ruiz-Hernández, A. L., & Torres-Gutiérrez, E. (2010). A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57–80. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2010.1001000057x>
- Sant'Anna, M. R. V., Soares, A. C., Araujo, R. N., Gontijo, N. F., & Pereira, M. H. (2017). Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints

- and biological adaptations. *Journal of Insect Physiology*, 97, 20–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.08.004>
- Schmuñis et al. (1977). La enfermedad de Chagas congénito. *Medicina*, 37(1), 47–53.  
[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Secretaría de Salud. (2019). Manual De Procedimientos Para La Enfermedad De Chagas En México. *Secretaría De Salud*, 1–109.  
[www.gob.mx/salud/%0Ahttps://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual\\_de\\_Procedimientos\\_para\\_la\\_Enfermedad\\_de\\_Chagas\\_en\\_Mexico.pdf](https://www.gob.mx/salud/%0Ahttps://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf)
- Shikanai-Yasuda. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V, Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., & Witfner, M. (1992). *Chagas ' Disease*. 5(4), 400–419.
- Tay, J., S., P. M. S., Bucio, M. I., Zarate, R., & Zarate, L. (1981). Estado actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad de chagas en la Republica Mexicana. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 14(1), 29–67.  
<https://doi.org/10.1590/s0037-86821981000100004>
- Telleria et al. (2017). *American Trypanosomiasis, 100 Years of Research Chagas Disease*. <https://doi.org/9780128010693>
- Villalobos, G., Martínez-Hernández, F., De La Torre, P., Laclette, J. P., & Espinoza, B. (2011). Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) one of the main vectors of Chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3), 490–497.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0508>
- Villanueva-Lizama, L., Teh-Poot, C., Majeau, A., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Molecular genotyping of trypanosoma cruzi by nextgeneration sequencing of

the mini-exon gene reveals infections with multiple parasite discrete typing units in chagasic patients from Yucatan, Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 219(12), 1980–1988. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz047>

Werner Apt Baruch et al. (2011). Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas. In *Artículo Salud* (Vol. 1, Issue 1). [https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518](https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518)

Wygodzinsky y Lent. (1979). *REVISION OF THE TRIATOMINAE (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), AND THEIR SIGNIFICANCE AS VECTORS OF CHAGAS' DISEASE*. 163.

Zarate et al. (1985). A Checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of México'. In *International Journal of Entomology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 102–127).

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>