



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos
de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Teresa Itandehui Martínez Cuevas

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Ciudad de México

Febrero 2018.

ASESORES:

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Profesor del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

Dra. María Teresa Estrada García

Profesor del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

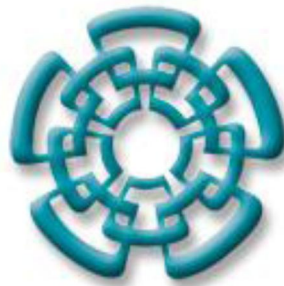
Profesor del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN.

Dr. José Luis Rosales Encina

Profesor del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN.

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Profesor de la unidad de Biomedicina FES-Iztacala, UNAM.



Este estudio se realizó en el departamento de Biomedicina Molecular Del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rebeca G. Manning Cela.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Durante el desarrollo de este trabajo la sustentante fue becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA.

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Rebeca Manning directora de este trabajo de investigación, porque ha sido un gran apoyo, consejera y maestra a lo largo de todo este camino.

A mis compañeros del laboratorio: Alberto, Margarita, Anais, Jorge, Claudia.

A mis amigos: Dr. Gilberto y Dr. Luis Alberto porque sus enseñanzas siempre estarán presentes.

A Osman por todo tu apoyo, consejo y compañía pero principalmente porque siempre estás ahí, dándome ánimos para seguir adelante.

A mis amigas Berenice y Virimar, porque gracias a sus palabras de aliento y apoyo incondicional e afrontado los momentos en los que alguna vez flaqueo.

A mis padres porque todo ha sido gracias a ustedes, su amor incondicional, su apoyo, sus consejos, sus ánimos para seguir luchando siempre hacen que todo sea posible ¡Son un orgullo!

A mis hermanos que son pilar fundamental en mi vida y mi inspiración día a día.

Gracias a todos aquellos que hicieron posible la culminación de este trabajo, porque sin su apoyo no hubiera sido posible.

ÍNDICE GENERAL.

I.	ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1.	Trypanosoma cruzi agente causal de la enfermedad de Chagas	1
1.2.	Enfermedad de Chagas	2
1.3.	Epidemiología	4
1.3.1.	Epidemiología en México	5
1.4.	Transmisión de la infección por <i>T. cruzi</i>	7
1.5.	Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi.....	10
1.6.	Genoma de Trypanosoma cruzi.....	12
1.7.	Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i>	15
1.7.1.	Caracterización biológica.....	15
1.7.2.	Caracterización bioquímica.....	17
1.7.3.	Caracterización molecular	18
1.8.	Caracterización de <i>T. cruzi</i> en México	20
1.9.	Patología de la enfermedad de Chagas y los genotipos de <i>T. cruzi</i>	22
1.10.	Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	23
II.	ANTECEDENTES DIRECTOS	25
2.1.	Identificación de antígenos de <i>T. cruzi</i>	25
III.	JUSTIFICACIÓN.....	30
IV.	HIPÓTESIS.....	30
V.	OBJETIVOS.....	31
5.1.	Objetivo general.....	31
5.2.	Objetivos particulares.....	31
VI.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1.	Parásitos	35

7.2.	Cultivos celulares.....	36
7.3.	Modelo animal.....	36
7.4.	Sueros e identificación de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i>	36
7.5.	Aislamiento y axenización del cultivo de parásitos	37
7.5.1.	Nomenclatura de los aislados.....	38
7.6.	Obtención de tripomastigotes	38
7.7.	Extracción de ADN.....	39
7.8.	Caracterización biológica y genotipificación.....	39
7.8.1.	Genotipificación	39
7.8.2.	Curva de crecimiento.....	42
7.8.3.	Curvas de transformación	42
7.8.4.	Análisis morfométrico.....	43
7.8.5.	Análisis in vitro de la capacidad infectiva.....	43
7.8.6.	Análisis in vivo de la capacidad infectiva	44
7.9.	Extracción de proteínas	44
7.10.	Cuantificación de proteínas.....	44
7.11.	SDS-PAGE	45
7.12.	Western blot.....	45
7.13.	Ensayo de Inmunoprecipitación	46
7.14.	Identificación de las proteínas inmunogénicas.....	47
VIII.	RESULTADOS.....	49
8.1.	Obtención de aislados.....	49
8.2.	Genotipificación	50
8.3.	Caracterización biológica	57
8.3.1.	Curva de crecimiento	57
8.3.2.	Curvas de transformación.....	58
8.3.3.	Análisis morfométrico.....	63
8.3.4.	Análisis in vitro de la capacidad infectiva de los parásitos aislados.....	64
8.3.5.	Análisis in vivo de la capacidad infectiva de los parásitos aislados en un modelo murino	66
8.4.	Identificación de antígenos	70

8.4.1.	Caracterización de los sueros humanos reactivos a <i>T. cruzi</i>	71
8.4.2.	Análisis de WB.....	78
8.4.3.	Inmunoprecipitación y detección de antígenos de epimastigotes	80
8.4.4.	Inmunoprecipitación y detección de antígenos de tripomastigotes.....	86
IX.	DISCUSIÓN	99
X.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	109
XI.	CONCLUSIÓN.....	109
XII.	PERSPECTIVAS.	110
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
APENDICE I.	Datos generales de los sueros reactivos y no reactivos	146
APENDICE II.	Caracterización de los sueros, reactivos y no reactivos.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución de individuos infectados con <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2. Distribución de las principales especies de triatomíneos de importancia epidemiológica	8
Figura 3. Fuentes de transmisión de <i>T. cruzi</i>	10
Figura 4. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 5. Distribución de las diferentes DTU de <i>T. cruzi</i> en México.....	21
Figura 6. Genotipo, distribución del parásito y la patología de la Enfermedad de Chagas	23
Figura 7. Origen biológico de antígenos de <i>T. cruzi</i> que han sido evaluados con sueros humanos.....	26
Figura 8. Estrategia experimental.....	32
Figura 9. Identificación de formas de <i>T. cruzi</i> en heces de triatomíneos.....	49
Figura 10. Determinación de la especie de los parásitos aislados, amplificando la secuencia repetida nuclear C6 de <i>T. cruzi</i>	52
Figura 11. Método empleado para la genotipificación de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 12. Identificación de TcI mediante la amplificación del IR-Miniexón de <i>T. cruzi</i> .	54
Figura 13. Identificación de TcV mediante la amplificación del dominio D7 del gen 24Sα ARNr	55
Figura 14. Identificación de TcII mediante la amplificación del dominio variable del gen 18S ARNr	56
Figura 15. Curvas de crecimiento.....	58

Figura 16. Evaluación de la eficiencia de metaciclologénesis de los aislados y cepas de referencia	60
Figura 17. Transformación extracelular de epimastigotes en tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante de un cultivo celular de fibroblastos NIH 3T3	62
Figura 18. Infección in vitro de los aislados.....	66
Figura 19. Curvas de parasitemia	68
Figura 20. Western blot de extractos totales de tripomastigotes.....	79
Figura 21. Perfil de Inmunoprecipitación de epimastigotes	82
Figura 22. Análisis de función de las proteínas antigénicas de epimastigotes	83
Figura 23. Perfil de inmunoprecipitación de tripomastigote	87
Figura 24. Posible localización celular de las proteínas antigénicas de tripomastigotes	89
Figura 25. Proteína de tripomastigote con repetidos antigénicos a lo largo de su secuencia	91
Figura 26. Grupos de epítomos de acuerdo con su valor predictivo	95
Figura 27. Ensayo de ELISA comercial Chagastest ELISA CHAGAS III (GrupoBios-BiosChile®)	151
Figura 28. ELISA con extracto total de epimastigotes de distintas cepas mexicanas utilizada en el InDRE.....	152
Figura 29. ELISA casero con extractos totales de epimastigotes de la cepa Querétaro y de la cepa Y	155
Figura 30. ELISA casero con extractos totales de tripomastigotes de la cepa Querétaro	157

Figura 31. ELISA casero con extracto total de proteínas de tripomastigote de la cepa Querétaro	159
Figura 32. Detección de ADN de <i>T. cruzi</i> en muestras serológicas mediante la amplificación de la secuencia repetida C6 de DNA nuclear del parásito.....	160
Figura 33. Detección de <i>T. cruzi</i> en muestras serológicas a través de la amplificación de la secuencia repetida C6.....	162
Figura 34. Detección de <i>T. cruzi</i> mediante la amplificación del IR-Miniexón de muestras serológicas	164

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Aislados de parásitos	35
Tabla 2. Cepas de parásitos.....	36
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de los aislados	41
Tabla 4. Aislados obtenidos, nomenclatura y características de su origen.	50
Tabla 5. Mediciones morfométricas de epimastigotes.....	64
Tabla 6. Máximos niveles de parasitemia, día máximo de parasitemia y sobrevivencia de ratones Balb/c.	70
Tabla 7. Aislado de <i>T. cruzi</i> utilizados para la identificación de antígenos.....	71
Tabla 8. Datos generales de los pacientes.	72
Tabla 9. Información general de la caracterización de los sueros.....	74
Tabla 10. Amplificación de secuencias especie-específicas de <i>T. cruzi</i>	76
Tabla 11. Alineamiento de un epítopo predicho de epimastigotes	85
Tabla 12. Alineamiento de epítopos predicho de epimastigotes que presenta más del 80% de identidad con otros microorganismos.....	86
Tabla 13. Número de veces que se repiten los epítopos identificados en 428 proteínas de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , inmunoprecipitadas con sueros humanos reactivos al parásito.	90
Tabla 14. Número de epítopos con valor predictivo mayor a 0.8	92
Tabla 15. Alineamiento realizado a la proteína XP_811491.1 de tripomastigotes con repetidos antigénicos.	93
Tabla 16. Alineamiento de la proteína XP_810457.1 de tripomastigote.....	94

Tabla 17. Proteínas seleccionadas por MVPE, homología y reproducibilidad.	95
Tabla 18. Proteínas extracelulares o de membrana plasmática con MVPE 0.98-0.95..	96
Tabla 19. Proteínas halladas en tes experimentos independientes con MVPE \geq 0.95..	97
Tabla 20. Sueros reactivos utilizados en este trabajo (Parte 1)	146
Tabla 21. Sueros reactivos utilizados en este trabajo (Parte 2)	147
Tabla 22. Sueros no reactivos utilizados en este trabajo (Parte 1)	148
Tabla 23. Sueros no reactivos utilizados en este trabajo (Parte 2)	149
Tabla 24. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizada en el InDRE ...	153
Tabla 25. Resultados obtenidos en un ensayo de ELISA con extracto total de epimastigotes de la cepa Querétaro y cepa Y.....	156
Tabla 26. Resultados obtenidos en ELISA con extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro	158

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
µl	Microlitros.
µm	Micrómetros.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNk	Ácido Desoxirribonucleico del kinetoplasto.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNg	Ácido Ribonucleico guía.
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero.
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal.
ARNsl	Ácido Ribonucleico del líder de empalpe (por sus siglas en ingles <i>Spliced Leader</i>)
ARNsno	Ácido Ribonucleico nuclear pequeño (por sus siglas en ingles <i>Small nucleolar</i>).
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
C ₆ H ₂ O ₆	Glucosa.
Ca	Calcio.
CETS	Centros Estatales de Transfusión Sanguínea.
Cols.	Colaboradores.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> .
DTU	Unidades Discretas de Tipificación (<i>Discrete Unit Typing</i>).

ECh	Enfermedad de Chagas
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EF	Electroforesis.
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada por sus siglas en inglés <i>En Green flourescent Protein</i> .
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (siglas en inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
ENT	Espaciadores no Transcritos.
H+	Ión de Hidrogeno
HAI	Hemaglutinación indirecta.
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.
IP	Inmunoprecipitación.
IR- Miniexón	Región intergénica del miniexón.
Kb	Kilobases.
KCl	Cloruro de Potasio.
LDL	Lipoproteína de baja densidad (por sus siglas en inglés Low-density Lipoprotein).
LIT	Infusión de Hígado Triptosa (Liver Infusion Triptose)
M	Molar.
MASP	Proteínas de superficie asociadas a mucinas.
Mb	Megabases.
Mg	Magnesio.

MLEE	Elelectroforesis de Enzimas Multilocus (por sus siglas en ingles <i>Multilocus Enzyme electrophoresis</i>).
mM	milimolar
MVPE	Mayor Valor Predictivo de Epítopo.
Na.	Sodio.
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibasico
nm.	nanometros.
°C	Grados Centigrados.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
P	Fosforo
Pb	Pares de bases.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PCR	siglas en inglés de reacción en cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).
pH	Potencial de Hidrogeno.
PM	Peso Molecular.
PPi	Pirofosfato iónico
PPM	Metaloproteasas
<i>R. prolixus</i>	<i>Rodnius prolixus</i> .
RAPD	amplificación al azar de ADN polimórfico (por sus siglas en ingles <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)

RE	Retículo Endoplásmico
RFLP	Patrones del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción.
SER	Elementos del Espaciador Repetitivos (<i>Spacer Repetitive Element</i>).
SFB	Suero Fetal Bovino
SL	Líder de empalpe (<i>spliced Leader</i>).
<i>T. barberi</i>	<i>Triatoma barberi</i> .
<i>T. bolivari</i>	<i>Triatoma bolivari</i> .
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cogonlense</i>	<i>Trypanosoma cogonlense</i> .
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
<i>T. dimidiata</i>	<i>Triatoma dimidiata</i> .
<i>T. mazzotti</i>	<i>Triatoma mazzotti</i> .
<i>T. pallidipennis</i>	<i>Triatoma pallidipennis</i> .
<i>T. phyllosoma</i>	<i>Triatoma phyllosoma</i> .
<i>T. picturata</i>	<i>Triatoma picturata</i> .
<i>T. rangeli</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i> .
TcI	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU I
TcII	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU II
TcIII	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU III
TcIV	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU IV

TcV	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU V
TcVI	<i>Trypanosoma cruzi</i> DTU VI
UABJO	Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
V	volumen.
WB	<i>Western Blot.</i>
WT	<i>Wild type.</i>
Z1	Zimodema 1.
Z2	Zimodema 2.
Z3	zimodema 3.
Zn	Zinc.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas (ECh) 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. Esta diversidad genética ha permitido clasificar al parásito en seis DTU (*Discrete Typing Units*) de TcI a TcVI. A pesar de la alta prevalencia de la ECh en México, se han obtenido y caracterizado pocos aislados del parásito. Por lo tanto, en el presente estudio se obtuvieron 8 aislados de *T. cruzi* a partir de heces de triatomíneos recolectados en el Istmo y Sierra Sur de Oaxaca, un estado altamente endémico de la ECh. Los parásitos se aislaron y axenizaron en medio LIT y se determinó su DTU, sus características biológicas y su perfil antigénico. La genotipificación de los aislados, mediante la amplificación de las secuencias de IR-miniexon, 24S α rARN y 18S rARN, mostró la prevalencia de cepas TcI (75%), así como de cepas TcII (12.5%) y TcV (62.5%), encontrándose tanto como un solo DTU o en mezclas (TcI-TcII y TcI-TcV). Estos resultados indican una mayor diversidad genética de *T. cruzi* en Oaxaca que la estimada previamente. La caracterización biológica de los aislados, mostró las mismas tasas de crecimiento y características morfométricas de los parásitos, pero una heterogeneidad en su capacidad de metaciclologénesis en medio TAU3AAG ($0.68\pm 0.60\%$ a $40.66\pm 3.50\%$), diferenciación extracelular en DMEM con SFB al 2% ($1.84\pm 0.71\%$ a $17.25\pm 1.23\%$ a las 24 horas, y $11.77\pm 0.90\%$ a $35.30\pm 3.02\%$ a las 48 horas), e infectividad en cultivo celular (0.75 ± 0.14 a $8.67\pm 0.52\%$ a las 18 horas) y en un modelo murino (0 a 2395 parásitos/ml). A través de ensayos de *Western blot* se observó un perfil de reconocimiento distinto entre diferentes cepas del parásito cuando son reconocidos con sueros reactivos a *T. cruzi*, indicando su variabilidad antigénica. Finalmente, ensayos de inmunoprecipitación con sueros reactivos a *T. cruzi* ligados a espectrometría de masas y secuenciación masiva, identificaron un total de 64 proteínas y 721 epítomos en epimastigotes, y 432 proteínas y 8170 epítomos en tripomastigotes, generando una plataforma de posibles antígenos útiles para estudios futuros. Estos resultados en conjunto proporcionan información genética, biológica y antigénica de las cepas de *T. cruzi* autóctonas de Oaxaca, que contribuyen en el entendimiento de la eco-epidemiología de la infección de *T. cruzi* en Oaxaca y sientan las bases necesarias para estudios futuros.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, shows a genetic diversity that results in a variety of its biological, biochemical, molecular and antigenic characteristics and their possible relationship with the different clinical manifestations of the disease. This heterogeneity has allowed the classification the parasite strains into six DTU (Discrete Typing Units) from TcI to TcVI. Even though the high prevalence of Chagas disease in Mexico, few *T. cruzi* isolates have been obtained and characterized so far. Therefore, in the present study were obtained eight isolates of *T. cruzi* from triatomines feces collected in the Istmo and Sierra Sur of Oaxaca that is an endemic State for Chagas disease. The parasites were isolated and axenized in LIT medium, and then their DTU, biological characteristics, and antigenic profile were determined. Genotyping of the isolates by the amplification of the IR-miniexon sequence, 24 S α ARNr and 18 S ARNr sequences, showed the presence of TcI (75%), TcII (12.5%) and TcV (62.5%) strains, present as single or as mixed DTUs (TcI-TcII and TcI-TcV). These results indicate a more diversity of *T. cruzi* DTUs in Oaxaca than previously estimated. The biological characterization of the isolates showed the same growth rates and morphometric characteristics. However, they exhibited a heterogeneity in their metacyclogenesis capacity in TAU3AAG medium ($0.68 \pm 0.60\%$ at $40.66 \pm 3.50\%$), extracellular differentiation in DMEM with 2% FBS ($1.84 \pm 0.71\%$ to $17.25 \pm 1.23\%$ at 24 hours, and $11.77 \pm 0.90\%$ at $35.30 \pm 3.02\%$ at 48 hours) and infectivity in cell culture (0.75 ± 0.14 to $8.67 \pm 0.52\%$ at 18 hours) and in a mouse model (0 to 2395 parasites / ml). Western blot assays showed different antigenic profiles of different parasite strains with reactive sera against *T. cruzi*, indicating their antigenic variability. Finally, immunoprecipitation assays with reactive sera against *T. cruzi* linked to mass spectroscopy and massive sequencing, identified a total of 64 proteins and 721 epitopes in epimastigotes, and 432 proteins and 8171 epitopes in trypomastigotes, generating a platform of potential antigens for future studies. These results include genetic, biological and antigenic information of *T. cruzi* strains autochthonous from Oaxaca, which provide information of the ecoepidemiology of *T. cruzi* infection in Oaxaca and set the necessary bases for future studies.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. *Trypanosoma cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario unicelular perteneciente al orden *Kinetoplastida* (Honigberg, Balamuth et al. 1964, Vickerman 1976), familia *Trypanosomatidae* (Grobber 1905) y género *Trypanosoma*. Es el agente causal de la enfermedad de Chagas (ECh) o Tripanosomiasis americana, la cual infecta una amplia variedad de mamíferos salvajes y domésticos, así como muchas especies de vectores triatomíneos, además de los humanos. Hace más de 100 se reportó el primer caso de ECh, y se identificó a *T. cruzi* como el agente etiológico por Carlos Chagas en 1909 en Brasil. La ECh es una enfermedad endémica de Latinoamérica y propia de las zonas rurales; sin embargo, los movimientos migratorios de personas infectadas a zonas urbanas y países desarrollados han provocado que se reporten casos de infección por el parásito países como Estados Unidos y Canadá, así como en otros continentes (Europa, Asia y Oceanía) en donde antes no se encontraban personas con ECh (**Figura 1**) (Chagas 1909, Schmunis and Cruz 2005, Schmunis and Yadon 2010, Ribeiro, Nunes et al. 2012).

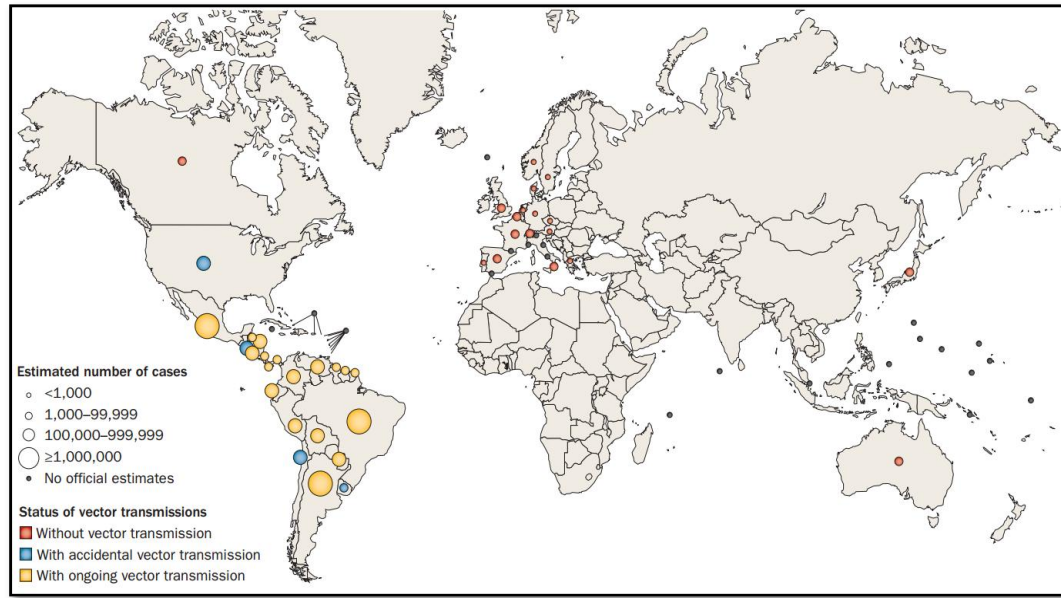


Figura 1. Distribución de individuos infectados con *T. cruzi*. Distribución de personas infectadas con el parásito en el mundo, de acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud en 2010. Tomado de (Ribeiro, Nunes et al. 2012).

1.2. Enfermedad de Chagas

La ECh se caracteriza por presentar dos fases, una fase inicial o fase aguda y una fase crónica, que a su vez se subdivide en una etapa latente o indeterminada y una etapa sintomática. La fase aguda normalmente cursa como una infección desapercibida ya que los síntomas son poco específicos y pueden confundirse con diversos padecimientos. Aproximadamente del 1-5% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan síntomas agudos, los cálculos en la tasa de letalidad para la ECh aguda varían de menos del 5% a aproximadamente el 8% en las personas inmunológicamente competentes y las muertes se producen principalmente en niños pequeños con miocarditis aguda o meningoencefalitis. Algunos de los síntomas que se pueden presentar durante esta fase son fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza y crecimiento de hígado, bazo y ganglios. Un signo característico en esta fase es la presencia de una reacción inflamatoria en la zona donde ha ocurrido la infección conocido como chagoma y si la vía de entrada es a través de la conjuntiva ocular se puede presentar una reacción inflamatoria con crecimiento de los nódulos linfáticos regionales, así como un edema

unilateral de ambos párpados conocido como signo de Romaña (presente entre el 20 y 25% de los casos). La fase aguda dura de 4-8 semanas y los niveles de parasitemia pueden ser detectados hasta 90 días después del ingreso del parásito al organismo, razón por la cual durante esta etapa el diagnóstico se realiza mediante métodos microscópicos, aunque muchas veces se suele confundir a *T. cruzi* confundido con otros tripanosomátidos tales como *Leshmania sp.* o *T. rangeli* (Coura and Borges-Pereira 2010, Rassi, Rassi et al. 2012, Ribeiro, Nunes et al. 2012).

Generalmente la fase aguda tiende a resolverse sola y la mayoría de los pacientes ingresan a la fase crónica. Primero se presenta una etapa indeterminada que puede existir durante 10 o 20 años, y dependiendo del área geográfica aproximadamente del 40-90% de los pacientes permanece en etapa indeterminada. Se caracteriza por no presentar ningún signo o síntoma de la enfermedad con radiologías del corazón, esófago y colón normales. Sin embargo, en esta fase de ECh los pacientes muestran seroreactividad a *T. cruzi*, aunque estos raramente son detectados durante esta fase debido a que no presentan ninguna evidencia clínica. También se ha reportado que algunos pacientes pueden reactivar la infección rápidamente y mostrar altos niveles de parasitemia durante un proceso de inmunosupresión severa (Dias 1989, Coura 2007, Coura and Borges-Pereira 2010).

La etapa clínica se presenta después de un largo periodo de incubación posterior a la etapa indeterminada produciendo daño al tejido muscular del corazón, síndromes digestivos y neurológicos, que generalmente conducen a la muerte debido a que no existe tratamiento que elimine al parásito en esta etapa de la enfermedad (Salazar-Schettino, Bucio et al. 2006). La CDC calcula que entre el 20 y el 30% de los humanos infectados con *T. cruzi* desarrollan eventualmente enfermedad crónica; mientras que cálculos hechos por otras fuentes indican que esto varía del 10 al 50%, desconociéndose hasta el momento el motivo por el cual la enfermedad evoluciona en algunos pacientes y no en otros. Se ha propuesto que es posible que se relacione a factores genéticos del hospedero, dosis de los parásitos, número de inoculaciones, cepa del parásito y a factores inmunológicos o nutricionales de las personas infectadas. Las cardiopatías son el daño más frecuente en pacientes chagasicos (40-60%) y generalmente mortales ya

que causan daño severo, dentro de las patologías que se pueden presentar se encuentran arritmias, insuficiencia cardíaca, bloqueo auriculoventricular y de rama y tromboembolismo. Además, se ha observado muertes cerebrovasculares a causa de los daños cardíacos en zonas endémicas los daños (Coura and Borges-Pereira 2010, Lima-Costa, Matos et al. 2010, Spickler 2010, Ribeiro, Nunes et al. 2012).

Pese a que la forma digestiva en la etapa crónica de la ECh es menos frecuente se estima que del 10% al 21% de las personas presentan cuadros clínicos relacionados con estos daños. Dentro de las complicaciones más severas se ha observado que en algunas zonas endémicas cerca del 5-8% de los pacientes cursa con esofagopatía crónica, y 4-6% desarrollan colopatía crónica. Estas manifestaciones clínicas se deben principalmente a disperistalsis del esófago y el colon causada por la destrucción del plexo mientérico, lo que conduce a un megaesófago y megacolon consecuentes. Aun cuando las muertes por estos signos derivados de la infección por *T. cruzi* son menos frecuentes, se ha reportado que éstas son provocadas por vólvulos de un megacolon sigmoide dilatado, cáncer de esófago u obstrucción con torsión y necrosis del colon (Rocha, Ribeiro et al. 2003, Viotti, Vigliano et al. 2005, Coura 2007, Ribeiro, Nunes et al. 2012, Perez-Molina and Molina 2018).

1.3. Epidemiología

La ECh es endémica en 21 países de Latinoamérica, del sur de Estados Unidos al norte de Argentina y Chile. Las tasas de prevalencia más altas se encuentran en Bolivia (6.75%), Argentina (4.13%), El Salvador (3.37%), Honduras (3.05%) y Paraguay (2.54%). En los casos particulares de México y Brasil, pese a que se han reportado tasas de prevalencia de alrededor del 1%, debido a su gran población, aproximadamente un tercio de todas las personas infectadas con *T. cruzi* viven en estos dos países (Bern and Montgomery 2009, Kirchhoff 2011).

La ECh es la enfermedad parasitaria con el mayor índice de morbilidad y mortalidad en Latinoamérica, forma parte de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo. De acuerdo con datos del Banco Mundial en 1983 se estableció que en Latinoamérica la enfermedad de Chagas ocupa el primer lugar de las enfermedades

tropicales, y el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles, solo por debajo de las enfermedades respiratorias agudas, de las enfermedades diarreicas y del SIDA. Se estima que 6-7 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* en todo el mundo, principalmente en América Latina, donde la enfermedad de Chagas sigue siendo uno de los mayores problemas de salud pública, causando incapacidad en personas infectadas y más de 10 000 muertes por año. Además, se estima que 12.9% de la población mundial, aproximadamente 70 millones de personas, se encuentra en riesgo de contraer la infección por *T. cruzi* (Hotez, Alvarado et al. 2014, OMS 2017, Perez-Molina and Molina 2018).

Debido a movimientos la ECh puede transmitirse en regiones no endémicas convirtiéndose en una epidemia mundial. La prevalencia de infección en migrantes latinoamericanos que viven en Europa se estima en 4.2% mientras que en EUA se estima que unos 300 000 inmigrantes están infectados con *T. cruzi* (Bern and Montgomery 2009, Schmunis and Yadon 2010, Requena-Mendez, Aldasoro et al. 2015). La carga mundial anual estimada de morbilidad es de \$ 627.46 millones en costos de atención médica y 806,170 años de vida ajustados en función de la discapacidad (Perez-Molina and Molina 2018).

La cardiomiopatía chagásica es la principal causa de discapacidad ajustados a años de vida (AVAD) en adultos jóvenes económicamente activos en los países endémicos, por esta razón y la falta de atención hacia la enfermedad, la Tripanosomiasis Americana continúa siendo un importante problema de salud pública social y económica (Ramos Jr, Martins-Melo et al. 2010).

1.3.1. Epidemiología en México

Los primeros casos de la enfermedad de Chagas en México fueron descritos en 1940 por Luis Mazzotti en Teojomulco, Oaxaca, y posteriormente se detectaron otros casos en diversos estados del país, calculándose en los años setenta que las tasas de seroprevalencia variaban del 7 al 13% (Mazzoti 1940, Tay, Salazar Schettino et al. 1979, Velasco and Rivas 2008).

Pese a las evidencias que demostraban la presencia de la enfermedad de Chagas en México, la primera búsqueda de anticuerpos contra *T. cruzi* en nuestro país no se llevó a cabo hasta el año de 1988 por Velasco Castrejón y colaboradores. La mayor prevalencia se encontró en Chiapas (5,0%), Oaxaca (4,5%) y la región sureste, seguido de las llanuras centrales de la región templada de la Huasteca, que incluye los estados de Hidalgo (3,2%), San Luis Potosí (2.5%), Veracruz (3.0%) y Tamaulipas (1.6%), reportando una seroprevalencia nacional promedio de 1.6% que representa 1, 472, 000 personas infectadas en nuestro país (Velasco-Castrejon, Valdespino et al. 1992).

Una segunda encuesta seroepidemiológica fue realizada en 1994 por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) en colaboración con 18 Centros Estatales de Transfusión Sanguínea (CETS), realizada en 18 estados de la República Mexicana encontrando que el 1.5% de las muestras de donación contienen anticuerpos anti-*T. cruzi* (Guzmán Bracho, García García et al. 1998).

En 1996 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estimó que en México existe una incidencia anual de 44, 000 nuevos casos de la enfermedad de Chagas y una prevalencia actual de 1, 610, 000 personas infectadas. El Centro Nacional de Transfusión Sanguínea reporta hasta un 3.5% de bolsas de sangre contaminadas con el parásito en el país (Ramsey, Ordonez et al. 2000).

Datos recientes estiman que en México existen 1.1-2 millones de personas infectadas con el parásito y más de 71,000,000 de habitantes se encuentran en riesgo directo de adquirir la infección debido a la transmisión vectorial (Ramsey, Elizondo-Cano et al. 2014, Sanchez-Gonzalez, Figueroa-Lara et al. 2016).

La mayoría de los individuos infectados con *T. cruzi* son asintomáticos o sintomáticos sin reconocimiento clínico de etiología (insuficiencia cardíaca o megaviscera). Tan solo en la Ciudad de México, hospitales de tercer nivel como el Instituto Nacional de Cardiología y el Instituto Nacional de Pediatría, reportan desde 0.37% hasta 0.17% de donaciones de sangre con anticuerpos contra *T. cruzi*. Estos datos afectan a la población en zonas urbanas donde hay dos veces más donaciones de sangre (> 10.000 habitantes)

comparada con las poblaciones rurales en México (Sanchez-Gonzalez, Figueroa-Lara et al. 2016).

1.4. Transmisión de la infección por *T. cruzi*

La enfermedad de Chagas se transmite principalmente, en el 80% de los casos, a través de la orina y heces contaminadas del insecto vector perteneciente a la familia *reduviidae* de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus* agrupados en 137 especies que se encuentran ampliamente distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina (**Figura 2**) (Galvão, Carcavallo et al. 2003). Los principales vectores son *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* en los países del Cono Sur, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países del Pacto Andino y partes de América Central, y *T. dimidiata* y *T. barberi* en México (Rassi, Rassi et al. 2012).

Por lo general, éstos viven en las grietas y huecos de las casas en las zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre de mamíferos. En general, pican en una zona expuesta de la piel y pueden defecar cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota como resultado del efecto pruriginoso de las heces y empuja estas hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta (WHO 2002).

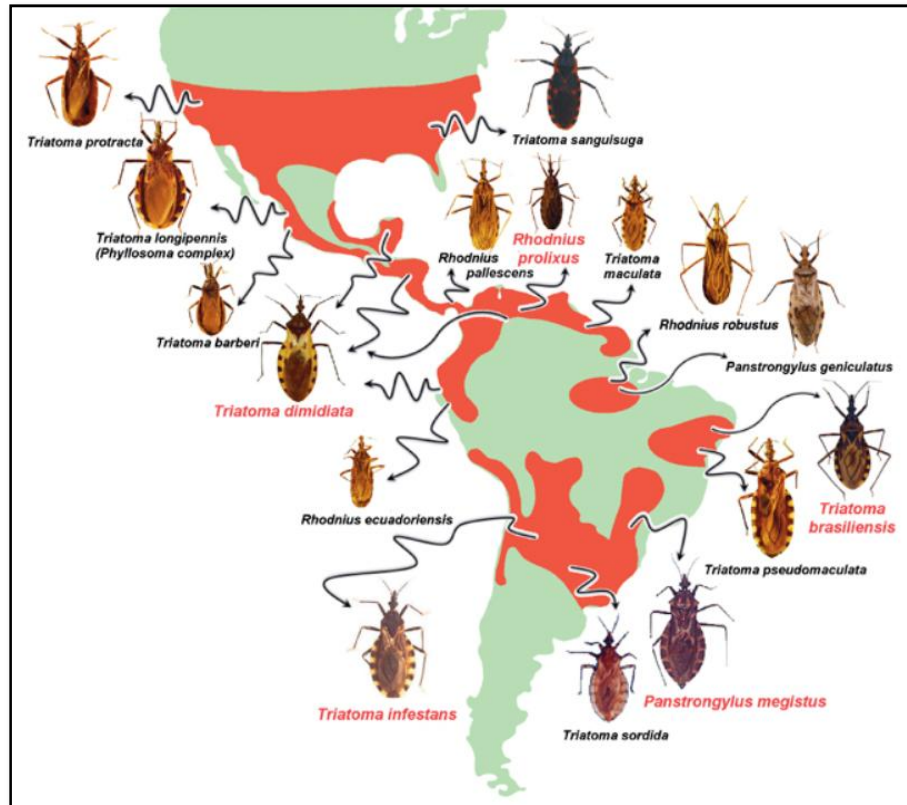


Figura 2. Distribución de las principales especies de triatominos de importancia epidemiológica. En rojo se muestran las especies que se consideran los vectores más importantes del parásito. Tomado de (Gourbière, Dorn et al. 2011).

Para que la infección humana por Chagas se produzca en condiciones naturales, primero debe producirse el contacto entre los triatominos infectados y los humanos. Después de esto, el resultado depende de una serie de variables que regulan las posibilidades de infección. Entre estos se encuentran la tasa de infección de triatominos por *T. cruzi*, el tiempo transcurrido entre la mordedura y la defecación, el número y cantidad de evacuaciones durante este intervalo de tiempo, el número de parásitos eliminados, el porcentaje de formas infectantes y su capacidad de penetración, el intensidad de la picazón durante la mordida (Coura and Borges-Pereira 2010).

En México se han reportado 31 especies de triatominos de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Dipetalogaster*, *Belminus*, *Eratyrus* y *Paratriatoma*, de las cuales se ha reportado que 21 de estas presentan infección natural por *T. cruzi* (Aguilar,

Noguera Torres et al. 1999, Vidal-Acosta, Ibáñez-Bernal et al. 2000). Entre los Estados de la República Mexicana con mayor número de especies de triatomos que son permisibles a la transmisión de la enfermedad se encuentra el Estado de Oaxaca, donde se han reportado 11 especies de triatomos como *Triatoma dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. mazzoti*, *T. pallidipennis* y *T. phyllosoma*, que destacan por su importancia como potenciales transmisores de *T. cruzi* (Zárate and Zárate 1985, Vidal-Acosta, Ibáñez-Bernal et al. 2000, Cruz-Reyes and Pickering-Lopez 2006).

Se han reportado otras fuentes de transmisión, dentro de las cuales la más importante es la que ocurre a través de transfusión de sangre infectada con *T. cruzi* que representa un 10-25% de los casos, lo que la coloca como la segunda vía de infección en países endémicos y la principal vía de infección en países no endémicos de la enfermedad de Chagas (Bern, Montgomery et al. 2008, Cancino-Faure, Fisa et al. 2015, Sanchez-Gonzalez, Figueroa-Lara et al. 2016). Otras formas menos comunes de transmisión del parásito son: por vía transplacentaria de la madre al feto durante el embarazo que va de 4.7 % en países endémicos a 2.7% en países no endémicos, por trasplante de órganos con infecciones no detectadas (hígado, corazón, médula ósea, riñón o sangre de cordón), por consumir alimentos contaminados con las heces de triatomos infectados, e infecciones por accidentes en los laboratorios donde se trabaja con este tipo de protozoarios (Torrico M. 1950, OPS 2002, Social 2009) (**Figura 3**).

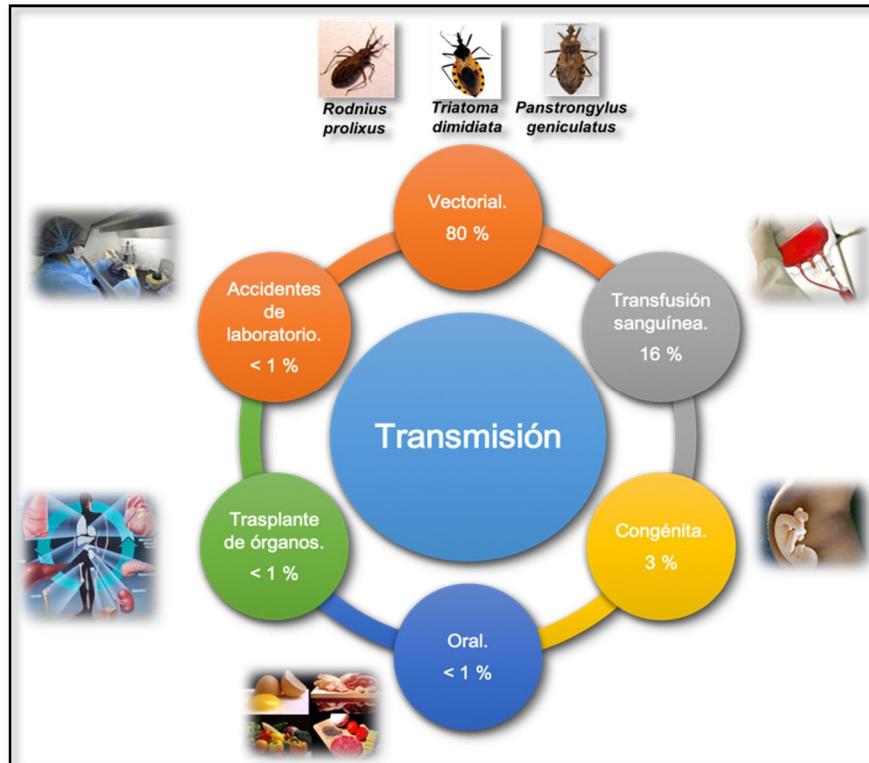


Figura 3. Fuentes de transmisión de *T. cruzi*. Existen diversas fuentes de transmisión del parásito siendo la infección a través de las heces del triatomino la más común en países endémicos a ECh (aproximadamente el 80% de los casos, la transfusión sanguínea de unidades contaminadas con el parásito es la segunda fuente de transmisión en países endémicos y la transmisión más común en países no endémicos. Existen otras fuentes de transmisión tales como la vía congénita (o vertical), la vía oral, por trasplante de órganos infectados con el parásito, y en menor medida por accidentes de laboratorios donde de diagnóstica o investiga al parásito.

1.5. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un parásito intracelular obligado con un ciclo de vida bifásico, ya que involucra a dos tipos de hospederos: uno invertebrado (insecto vector) y uno vertebrado (mamífero). Durante su ciclo de vida el parásito presenta cuatro estadios morfológicos bien definidos alternando dos estadios de desarrollo en cada uno de los hospederos (Brenner 1971).

Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el insecto vector al alimentarse de mamíferos infectados, transformándose en formas cortas en el estómago del insecto que

migran hacia el intestino medio en donde encuentran un ambiente adecuado para seguir desarrollándose y donde se diferencian en epimastigotes. Estos epimastigotes se desplazan a la porción posterior del intestino en el vector, donde se diferenciarán a tripomastigotes metacíclicos (TM) que es la forma que penetra e infecta al hospedero mamífero (Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999).

Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados por el insecto en las heces, penetrando en las células de mamíferos cercanas al sitio de la picadura del vector, así como por las mucosas y conjuntiva ocular por autoinoculación. Dentro del vertebrado el parásito infecta a células tanto fagocíticas como no fagocíticas donde se diferencia a su forma de amastigote y posteriormente a su forma de tripomastigote sanguíneo, los cuales son liberados por lisis celular pudiendo infectar a células vecinas, alcanzando el torrente sanguíneo y distribuirse a otros tejidos y órganos. El ciclo finaliza cuando un vector no infectado por *T. cruzi* se alimenta de sangre de un hospedero vertebrado infectado y adquiere a *T. cruzi* del torrente circulatorio (**Figura 4**) (Crane and Dvorak 1979, Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999).

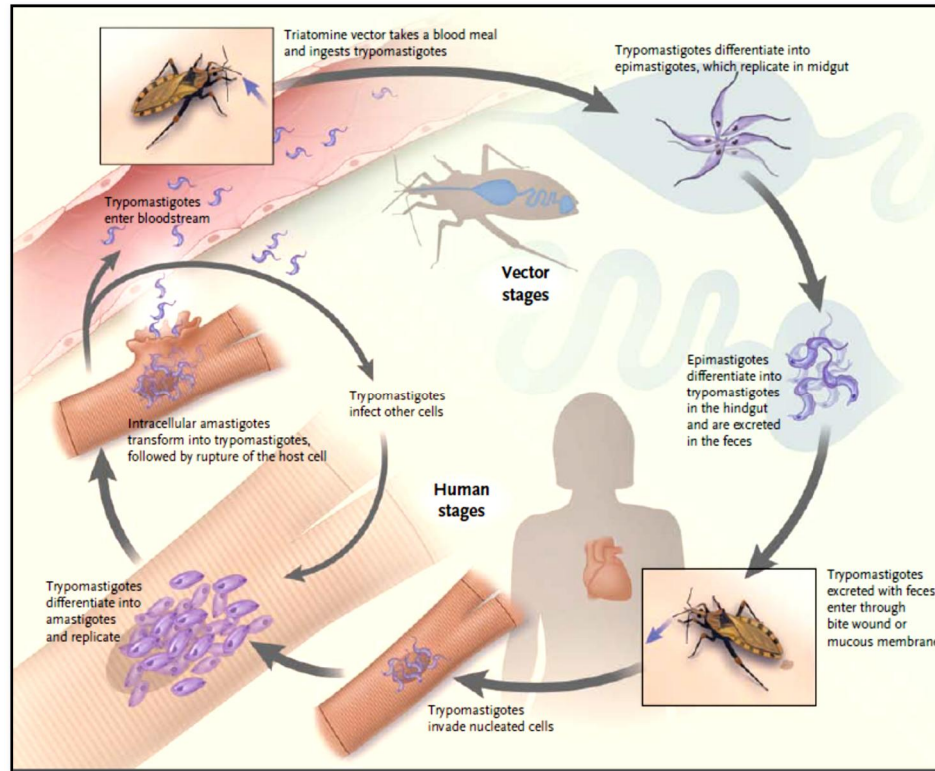


Figura 4. Ciclo biológico de *T. cruzi*. *T. cruzi* presenta un ciclo de vida bifásico, durante el cual presenta 4 estadios morfológicos característicos: las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico en el invertebrado (forma replicativa e infectiva, respectivamente), y el estadio de amastigote (forma replicativa) y tripomastigote sanguíneo (forma infectiva) en el hospedero mamífero, que incluye al humano. Tomado de (Bern 2011).

1.6. Genoma de *Trypanosoma cruzi*

El material genético de *T. cruzi* está organizado en dos estructuras bien caracterizadas. En el núcleo el ADN se encuentra en forma de pequeños cromosomas, los cuales no están bien condensados durante la división celular. Aproximadamente del 20-25% del ADN total del parásito se encuentra en el cinetoplasto, el cual está localizado en el interior de un organelo conocido como mitocondria y cerca del corpúsculo basal o cinetosoma (Souza, Lima et al. 2011). El cinetoplasto es una unidad común entre los tripanosomátidos y la posición que guarda con respecto al núcleo, ayuda a definir el estadio de desarrollo en el que se encuentra el parásito (Ray 1987).

El ADN del cinetoplasto (ADNk), está constituido por una red de 5,000 a 30,000 minicírculos y de 20 a 50 maxicírculos. Cada minicírculo tiene una longitud de 0,45 μm , lo que corresponde a 1440 pares de bases aproximadamente y un peso molecular de $0.94 \cdot 10^6$ Daltones. Los maxicírculos por otro lado tienen un tamaño de aproximadamente 10 μm y de 22 a 28 kb (Riou and Delain 1969). Los minicírculos varían muy rápidamente su secuencia debido a mutaciones puntuales y en cada uno de ellos existe una zona de secuencia constante que se repite cuatro veces por molécula y cuatro regiones divergentes intercaladas entre las primeras, que son similares en todas las moléculas de un mismo parásito y de distintas cepas. Los maxicírculos codifican productos génicos de la mitocondria (rARN y mARN de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria) que requieren de un procesamiento post-transcripcional denominado edición, utilizando RNA guías (gARN) que son codificados por los minicírculos (Lukes, Guilbride et al. 2002).

T. cruzi tiene un genoma nuclear predominantemente diploide, distribuido en pares homólogos de cromosomas (Dvorak, Hall et al. 1982). El tamaño de sus cromosomas no se ha podido determinar debido, entre otras razones, a que las cepas y clonas muestran variaciones entre un 40% a 50% en el tamaño de sus cromosomas y por lo tanto en su contenido de ADN (Castro, Craig et al. 1981, Lanar, Levy et al. 1981, Dvorak, Hall et al. 1982, Thompson and Dvorak 1989, McDaniel and Dvorak 1993, Santos, Cano et al. 1997, Lewis, Llewellyn et al. 2009, Souza, Lima et al. 2011).

La cepa CL Brener fue tomada como la cepa de referencia para secuenciar el genoma de *T. cruzi*. CL Brener tiene un genoma diploide, con un tamaño estimado de 87 Mpb, distribuido en 41 pares de cromosomas de tamaños variables, con 12 000 genes que codifica para 22, 570 proteínas de las cuales 12,570 forman pares alélicos (Dvorak, Hall et al. 1982, Cano, Gruber et al. 1995, Vargas, Pedroso et al. 2004, El-Sayed, Myler et al. 2005, Weatherly, Boehlke et al. 2009). Se han determinado muchos genes pertenecientes a grandes familias de proteínas de superficie, como las transialidasas, mucinas, gp63 proteasa y proteínas asociadas a mucinas (MASP), que representan cerca de 18% de todas las secuencias codificantes. También se ha identificado que los genes de *T. cruzi* comprenden secuencias codificantes para ARNr, SLRNA y snoRNAs. De aquellos genes

que codifican para proteínas aproximadamente al 50.8 % se le atribuyó su posible función basada en análisis de similitud (El-Sayed, Myler et al. 2005, Weatherly, Boehlke et al. 2009).

Estudios realizados con geles de electroforesis de campos pulsados (PFGE) a las cepas Esmeraldo cl3, SO3 cl5 y Silvio X10 cl11, refieren que tienen aproximadamente 65, 72, y 44 cromosomas con un genoma de 78.5 Mpb, 94.7 Mpb y 46.8 Mpb respectivamente (Vargas, Pedroso et al. 2004).

Se ha propuesto que la amplia variación en el tamaño del genoma que se observa entre especies eucariotas está más relacionada con la cantidad de ADN repetitivo que con el número de genes que codifican (Souza, Lima et al. 2011). Por lo tanto, siguiendo este mismo precepto, la variación del tamaño del genoma entre cepas y clones de *T. cruzi* podría ser atribuido a la amplificación y eliminación de varias secuencias repetidas como los retrotransposones y ADN satélite. En *T. cruzi* las secuencias repetidas tales como retransposones, repetidos subteloméricos, DNA satélite de 195 pb y genes de la súper familia de las moléculas de superficie llegan a representar del 30% al 50% del ADN nuclear total del parásito (Kooy, Ashall et al. 1989, El-Sayed, Myler et al. 2005, Martins, Baptista et al. 2008).

Estas divergencias en el genoma han llevado a la clasificación de las cepas de *T. cruzi* en seis Unidades de Tipificación Discretas o DTU (por sus siglas en inglés *Discrete Typing Units*). Algunos estudios sugieren que el genoma de las cepas que pertenecen a TcI es más pequeño que el genoma de las cepas pertenecientes a las otras DTUs y se cree que este hecho se debe a la relación entre distancias genotípicas y la cantidad de secuencias repetitivas tal como sugieren análisis realizados en la secuencia satélite de 195-pb que mostró que las cepas pertenecientes a TcI presentan menor cantidad de estas secuencias repetidas que las pertenecientes a otras DTUs (Briones, Souto et al. 1999, Henriksson, Dujardin et al. 2002, Pedroso, Cupolillo et al. 2003, Vargas, Pedroso et al. 2004, Souza, Lima et al. 2011).

1.7. Caracterización de cepas de *T. cruzi*

T. cruzi comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación intra-específica en cuanto a diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para las células hospederas (Brenner 1985).

Este comportamiento diverso del parásito puede estar influenciado por el hospedero, las condiciones del medio ambiente o las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi*. Por lo tanto, se ha incrementado la tendencia para caracterizar los diferentes aislados del parásito utilizando diversos métodos, lo que ha reflejado su marcada heterogeneidad a nivel bioquímico y molecular, así como la variabilidad en su comportamiento biológico (Dvorak 1977, Melo and Brenner 1978, Andrade 1985).

1.7.1. Caracterización biológica

La caracterización biológica realizada a diferentes cepas de *T. cruzi* ha permitido establecer que distintas cepas del parásito que proviene de diferentes o similares transmisores, reservorios y regiones de un mismo país se comportan distinto entre sí con respecto a su preferencia por determinado hospedero, su distribución geográfica, su virulencia y su tropismo tisular tanto en animales como en humanos, además de presentar algunas variaciones morfológicas de los tripomastigotes (Petana 1972, Brenner 1973, Brenner 1985, Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999).

Estudios comparativos sobre la asociación entre la diversidad genética subespecífica y las características biológicas del parásito, muestran diversidad en el comportamiento en cultivo de células de mamíferos, cultivos axénicos, la sensibilidad al fármaco *in vitro*, la transmisibilidad a través del insecto vector y la patogenicidad en ratones (Laurent, Barnabe et al. 1997, de Lana, da Silveira Pinto et al. 1998, Revollo, Oury et al. 1998). En algunos casos las mezclas de dos clones mostraron comportamientos distintos a lo que

se esperaba, como por ejemplo una sumatoria de su comportamiento individual, lo que sugiere la interacción entre los genotipos (Pinto, de Lana et al. 1998).

Algunos autores han valorado la virulencia (capacidad de multiplicación en el hospedero) y patogenicidad (capacidad de producir lesiones tisulares y de las respuestas inmunológicas) de distintas cepas en ensayos *in vivo* en modelos murinos. Estos estudios definen tres fenotipos principales designados como biodemas I, II y III (Andrade 1974, Andrade, Brodskyn et al. 1983).

En el biodema tipo I se agruparon cepas con altas tasas de multiplicación, altos niveles de parasitemia, y una mortalidad de 7 a 11 días después de la infección, con un predominio de formas delgadas y con un tropismo a macrófagos durante la fase temprana de la infección. Además de producir alteraciones neuronales más frecuentes que las cepas pertenecientes a otros biodemas. Los patrones de zimodemas de este biodema corresponden al zimodema Z2b, una variante de Z2 (Andrade and Magalhães 1997).

En el biodema tipo II se agrupan las cepas con tasas de multiplicación lenta y picos irregulares de parasitemia que van de 12 a 20 días después de la infección, en donde hay un intenso parasitismo del miocardio en la fase aguda, con desintegración de los miocitos parasitados y necrosis de los no parasitados, así como un intenso proceso de miocarditis, con afectación predominante del miocardio. Los patrones de zimodemas de este tipo de biodema corresponden a cepas del zimodema Z2 (Andrade and Magalhães 1997)

Las cepas agrupadas dentro del biodema tipo III presentan una lenta multiplicación con picos de parasitemia de 20 a 30 días después de la infección y con una mortalidad tardía, por lo general a partir del día 30 después de la infección. Además, hay predominio de formas amplias y determinan intensas lesiones miocárdicas y del músculo esquelético, con una acentuada proliferación intracitoplasmática de parásitos. El biodema tipo III corresponde al zimodema Z1. Debido a la miocarditis crónica intensa, las cepas de biodema tipo III se consideran las más patógena en ratones (Andrade 1974, Andrade and Magalhães 1997).

El grado de virulencia de la cepa puede variar dentro del mismo biotopo y entre los clones de la misma cepa (Andrade 1974, Postan, McDaniel et al. 1987). Otros estudios experimentales en modelos murinos apoyan y amplían estas observaciones y claramente indican que tanto los genotipos del parásito como del hospedero son importantes en la determinación de la distribución tisular, fisiopatología y el resultado final de la infección por *T. cruzi* (Andrade 1985, Andrade, Machado et al. 1999, Andrade, Machado et al. 2002, Andersson, Orn et al. 2003, Marinho, Bucci et al. 2004, Espinoza, Rico et al. 2010, Roellig and Yabsley 2010)

1.7.2. Caracterización bioquímica

Una forma de caracterizar las cepas de *T. cruzi* es por medio de métodos bioquímicos que permiten analizar los productos de expresión génica utilizando isoenzimas. La electroforesis de isoenzimas es uno de los ensayos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares, pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar a las diferentes cepas en los llamados zimodemas de acuerdo con sus perfiles isoenzimáticos idénticos (Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999).

En 1981 se introdujo la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi*, con la cual se identificaron 3 zimodemas en cepas de Brasil. El zimodema 1 (Z1) es de origen selvático y circula entre insectos triatomíneos selváticos siendo infectivo para el hombre; el zimodema 2 (Z2) es de origen doméstico y comprende cepas aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas aguda o crónica y de animales domésticos; el zimodema 3 (Z3) comprende cepas de casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que se ha aislado de armadillos y de algunos casos humanos con la forma aguda de la enfermedad (Miles, Cedillos et al. 1981, Saravia, Holguín et al. 1987).

La existencia del Z2 señala la fuerte posibilidad de que las isoenzimas pueden ser usadas para localizar o rastrear la transferencia de parásitos del ciclo selvático al doméstico. También se ha reportado heterogeneidad isoenzimática relacionada con la

distribución geográfica de las cepas del parásito (Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999). Estudios posteriores determinaron que las cepas de Brasil que corresponden al Z2 son más susceptibles al tratamiento farmacológico comparando con Z1 y Z3, observándose que los tratamientos previos aumentan la resistencia a las drogas (Luquetti, Miles et al. 1986, Carneiro, Romanha et al. 1991).

Algunos autores reportan que han detectado inestabilidad en los patrones isoenzimáticos, tanto en estudios realizados a subpoblaciones clonadas de una cepa de *T. cruzi*, cuando las cepas han tenido pases sucesivos por hospederos vertebrados e invertebrados o en medios de cultivo o de acuerdo con la etapa en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Esto ha dado lugar a zimodemas diferentes y ha demostrado que las cepas del parásito pueden ser heterogéneas en su composición (Brener 1985, Bogliolo and Godfrey 1987, Magalhaes, Andrade et al. 1996, Guzmán-Marín, Zavala-Castro et al. 1999). También se han detectado diferentes zimodemas en cepas aisladas provenientes de varios hospederos y de diversas zonas geográficas (Wendel, Brener et al. 1992).

1.7.3. Caracterización molecular

Para la caracterización molecular se han empleado diversos marcadores moleculares con el propósito de caracterizar y clasificar a las cepas de *T. cruzi*. Una de las primeras técnicas utilizadas fue el análisis de patrones de restricción de los minicírculos del ADNk y mediante esta técnica se pudieron identificar dos grupos de poblaciones denominadas esquizodemos (Morel, Chiari et al. 1980). También han sido utilizados los maxicírculos del ADNk y los espaciadores no transcritos del RNA ribosomal para formar dos agrupaciones denominadas cinetodemos (Dietrich, Dussan Mdel et al. 1990, Zavala-Castro, Velasco-Castrejon et al. 1992).

La existencia de este dimorfismo entre cepas se ha observado en estudios realizados con los genes ribosomales 18S, 5.8S y 24S α , así como con el análisis de la región intergénica del miniexón mostraron que *T. cruzi* podía ser clasificado en dos linajes denominados TcI y TcII (Souto and Zingales 1993, Clark and Pung 1994, Souto, Fernandes et al. 1996, Santos, Cupolillo et al. 2002)

Con la identificación de estos marcadores moleculares se han organizado dos grupos filogenéticos de *T. cruzi*: el linaje 1, que corresponde al zimodema 2 y el linaje 2 que corresponde al zimodema Z1. Sin embargo, las cepas pertenecientes al zimodema Z3 no se pueden clasificar en ninguno de estos los linajes (Kawashita, Sanson et al. 2001, Mendonca, Nehme et al. 2002).

Por esta razón algunos grupos de investigación continuaron con la caracterización de *T. cruzi* usando técnicas más sensibles que permitieran agrupar todas las cepas. El estudio genético de los tripanosomatidos puede desarrollarse mediante la amplificación de regiones anónimas al azar (RAPD por sus siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) y las secuencias resultantes pueden usarse para construir árboles filogenéticos. El empleo de este ensayo y de la electroforesis de multilocus de enzimas (MLEE por sus siglas en inglés *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) han identificado los multilocus fenotípicos de *T. cruzi* que revelan la existencia de seis DTU's. Este término fue propuesto para describir conjuntos de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población, y se identifican con marcadores moleculares comunes (Tibayrenc and Ayala 1988, Steindel 1993, Tibayrenc, Neubauer et al. 1993, Brisse, Barnabe et al. 2000, Zingales, Andrade et al. 2009).

El análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP), entre las seis DTU reveló la existencia de cuatro clases diferentes de secuencias de ADN en lugar de seis, llamándosele a estas cuatro diferentes secuencias haplogrupos (Machado and Ayala 2001, Sturm, Vargas et al. 2003, Broutin, Tarrieu et al. 2006). Dos de los cuatro haplogrupos están siempre presentes en TcV y TcVI, lo que evidencia el carácter predominantemente heterocigoto de sus alelos. Los patrones de nucleótidos en cada haplogrupo TcV/TcVI se parecen mucho a los alelos TcII y TcIII, lo que confirma a TcII y TcIII como los tipos parentales más probables de TcV y TcVI. A pesar de ser similares en muchos aspectos, TcV y TcVI son distinguibles por electroforesis de isoenzimas, marcadores de RNA ribosómico, ensayos de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), algunos marcadores de tipificación de secuencias multilocus (MLST) y mediante el análisis de microsatélites (Chapman, Baggaley et al. 1984, Souto, Fernandes et al. 1996, Barnabe, Brisse et al. 2000, Rozas, De Doncker et al. 2008, Lewis,

Llewellyn et al. 2011, Yeo, Mauricio et al. 2011). Sin embargo, los datos de diferentes MLST indican que las células parentales TcIII incluye caracteres derivados de TcI y TcII (Sturm, Vargas et al. 2003, Elias, Vargas et al. 2005, Tomazi, Kawashita et al. 2009). Así, TcIII, TcV y TcVI, podría ser el producto de un suceso de hibridación (Westenberger, Barnabe et al. 2005, lenne, Pedroso et al. 2010).

1.8. Caracterización de *T. cruzi* en México

A pesar de que en México se estima que 71 millones personas están en riesgo constante de contraer la infección de *T. cruzi* por transmisión vectorial (Sanchez-Gonzalez, Figueroa-Lara et al. 2016), es poco lo que sabe con respecto a la caracterización de las cepas de *T. cruzi* que circulan en el país.

Los primeros estudios de caracterización biológica de cepas aisladas en nuestro país mostraron heterogeneidad biológica (Lopez-Olmos, Perez-Nasser et al. 1998). Años después se identificaron distintos patrones patogénicos entre tres cepas aisladas de distintos hospederos en Puebla. Se encontró que el aislado obtenido de un mamífero silvestre era más infectivo, con una alta parasitemia en un modelo murino, mientras que otras dos cepas aisladas de humano y de triatomino respectivamente, mostraban un bajo índice de mortalidad y de parasitemia. Además, los aislados analizados mostraron un tropismo hacia el musculo de miocardio con diferentes grados de lesiones y se ha observado que los aislados mexicanos presentan variaciones en su virulencia y resistencia a benznidazol, aun perteneciendo a un mismo DTU (Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Monteón, Godínez et al. 2009, Espinoza, Rico et al. 2010, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011).

En cuanto a la caracterización bioquímica y molecular los estudios isoenzimáticos muestran una relativa homogeneidad entre los aislados mexicanos (Galván, Rubio et al. 1983, Lopez-Olmos, Perez-Nasser et al. 1998). En contraste, estudios posteriores basados en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) asociados con el espaciador intergénico de ARNr, indicaron heterogeneidad entre aislados provenientes de distintos estados del país (Zavala-Castro, Velasco-Castrejon et al. 1992).

Durante varios años se pensó que TcI era el único linaje presente en nuestro país, ya que estudios de caracterización molecular realizado en cepas aisladas en México fueron identificadas con este linaje (Bosseno, Barnabé et al. 2002, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006). Sin embargo análisis de genotipificación realizados directamente de muestras de heces de triatomos infectados con *T. cruzi* demostraron la presencia de TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI en triatomos domiciliarios y selváticos, y mamíferos de vida silvestres provenientes de diversas zonas de la República Mexicana (**Figura 5**) (Ruiz-Sanchez, Leon et al. 2005, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Bosseno, Barnabe et al. 2009, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011, Ramos-Ligonio, Torres-Montero et al. 2012, Ibanez-Cervantes, Martinez-Ibarra et al. 2013, Martinez, Nogueta et al. 2013, Lopez-Cancino, Tun-Ku et al. 2015).

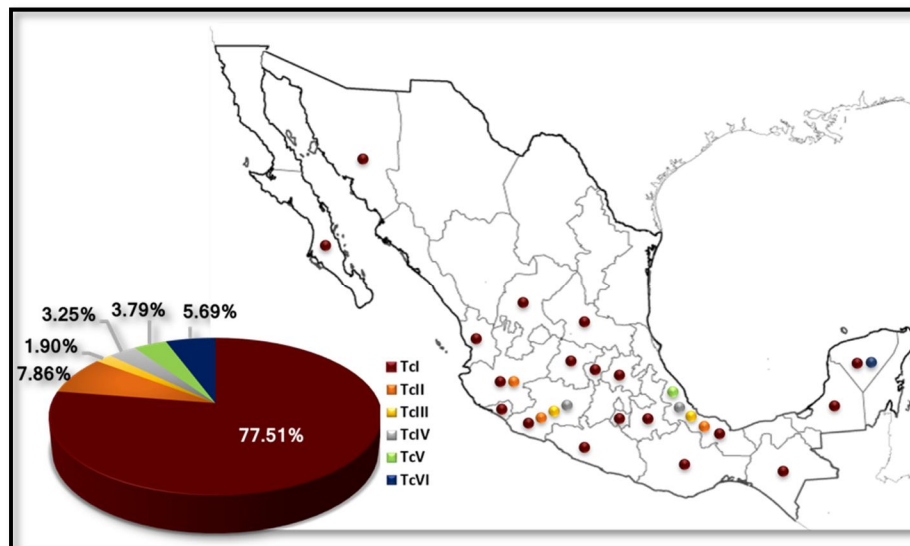


Figura 5. Distribución de la diferentes DTU de *T. cruzi* en México. En México se reporta la presencia de los seis DTU's, siendo TcI el más distribuido a lo largo del territorio nacional, mientras que el resto de los DTU's se concentran en la zona centro y sureste del país. Los datos para realizar el siguiente mapa fueron tomados de distintas fuentes: (Ruiz-Sanchez, Leon et al. 2005, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Bosseno, Barnabe et al. 2009, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011, Ramos-Ligonio, Torres-Montero et al. 2012, Ibanez-Cervantes, Martinez-Ibarra et al. 2013, Martinez, Nogueta et al. 2013, Lopez-Cancino, Tun-Ku et al. 2015).

1.9. Patología de la enfermedad de Chagas y los genotipos de *T. cruzi*

Se ha determinado que los diversos DTU muestran diferencias en la manifestación de los signos y síntomas de la enfermedad de Chagas en humanos. Como se mencionó anteriormente la enfermedad de Chagas presenta dos fases, una fase aguda y una fase clínica que inicia con una etapa indeterminada seguida por una etapa sintomática. Se ha sugerido que la frecuencia con que estas manifestaciones se presentan podría estar determinada por el tipo de DTU al que pertenece la (s) cepa (s) con la que se adquirió la infección, reportándose que en la mayor parte de los casos la fase aguda está dada por cepas pertenecientes a TcI, y con menor frecuencia por TcII, TcIII y TcIV (Coura 2007, Zingales, Miles et al. 2012). Además, la mortalidad y morbilidad de los individuos infectados con *T. cruzi* depende de la carga parasitaria y del genotipo del parásito con el que se ha infectado (**Figura 5**).

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.

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 (**Figura 6**) (Luquetti, Miles et al. 1986, Freitas, Lages-Silva et al. 2005, Lages-Silva, Ramirez et al. 2006, Burgos, Begher et al. 2008, Zingales, Miles et al. 2012).

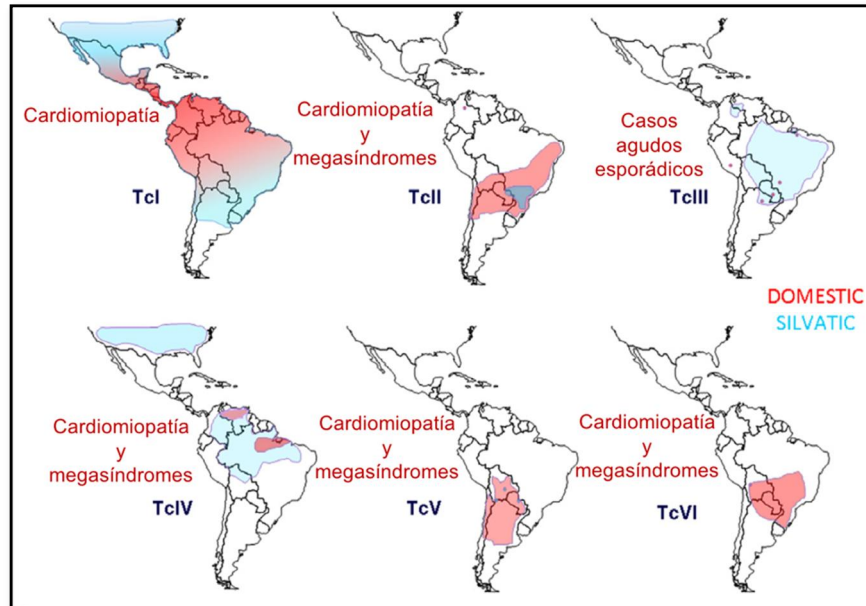


Figura 6. Genotipo, distribución del parásito y la patología de la Enfermedad de Chagas. Los diferentes genotipos del parásito tienen una distribución geográfica, un ciclo epidemiológico y patologías distintos entre ellos. Tomado y modificado de (Zingales, Miles et al. 2012).

1.10. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la infección con *T. cruzi* depende en gran medida de la fase de la enfermedad en la cual se encuentre la persona infectada con el parásito. En la fase aguda suelen utilizarse técnicas que implican la detección directa del parásito o de su material genético debido a que en esta fase se encuentran tripomastigotes liberados al torrente sanguíneo, utilizándose para su detección el examen en fresco, frotis sanguíneo, xenodiagnóstico y hemocultivo (WHO 2007). El empleo de métodos como strout y microhematocrito permiten la concentración de la muestra y un aumento en la sensibilidad del diagnóstico.

En la fase crónica de la enfermedad se emplean principalmente métodos de diagnóstico serológico, lo que implica la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*. Los métodos más comunes son inmunofluorescencia indirecta (IFA), hemaglutinación indirecta (IH), ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima (ELISA), western blot (WB) y el ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) (Monteón, Sosa et al. 1989, Pérez-Fuentes, D. C. Sánchez-Guillén et al. 1998, WHO 2007, Figueroa-

Lara 2009, Cervantes-Landin, Martinez-Martinez et al. 2014, OMS 2017). También se han realizado pruebas de PCR para la detección del parásito, en muestras sanguíneas y en algunos casos en tejidos, mostrando que la aplicación de este ensayo presenta la misma especificidad que las pruebas serológicas, aunque la sensibilidad del ensayo es menor que la prueba ELISA. El empleo de esta técnica es aún limitado para fines diagnósticos, puesto que representa un mayor costo respecto a las herramientas serológicas y se requiere de personal especializado, por lo que se utiliza solo para ciertos casos (como transmisión materno-fetal) y para investigación (Junqueira, Chiari et al. , Marcon, Andrade et al. 2002, Schijman, Bisio et al. 2011, Gilber, Alban et al. 2013).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1. Identificación de antígenos de *T. cruzi*

Como se ha mencionado anteriormente, el parásito presenta una gran diversidad de características biológicas que se cree pudieran estar estrechamente relacionadas con la patología de la enfermedad de Chagas en los humanos. En un intento por comprender por qué algunas cepas del parásito establecen alguna patología, y otras pueden mantener una infección sin producir daños importantes al humano, muchos grupos de investigación han buscado moléculas, tanto del parásito como del hospedero, que estén involucradas en el establecimiento de la infección.

La identificación de marcadores moleculares es una herramienta útil para el diagnóstico de personas que cursan la infección con *T. cruzi* y cuya determinación ha sido compleja puesto que, las diferentes pruebas diagnósticas para la fase crónica de la enfermedad presentan niveles variables de sensibilidad (44.2-100%) y especificidad (87.79-100%), repercutiendo en la obtención de un número importante de falsos negativos, falsos positivos y muestras indeterminadas. Por ello la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de dos pruebas convencionales (pruebas serológicas) con resultados similares para un diagnóstico más seguro. Además, en aquellos resultados séricos con reactividades discordantes deberán ser sometidos a una tercera evaluación con una técnica distinta a las que ya han sido empleadas (WHO 2007)

Diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar distintos marcadores serológicos (antígenos) y/o moleculares (secuencias genómicas especie-específicas) que permitan un diagnóstico más certero y confiable; sin embargo, aún no es posible contar con una prueba estándar para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

El antígeno empleado tiene un papel determinante en la sensibilidad y especificidad de la prueba. Entre la amplia variedad de antígenos utilizados los más comunes han sido extractos crudos de epimastigotes sonicados (Monteón, Sosa et al. 1989, Pérez-Fuentes, D. C. Sánchez-Guillén et al. 1998, Cervantes-Landin, Martínez et

al. 2014), proteínas extraídas de epimastigotes (Solana, Katzin et al. 1995, Partel and Rossi 1998), epimastigotes completos fijados (H Carbonetto, Malchiodi et al. 1989, Antas, Azevedo et al. 2000, Berrizbietia, Ndao et al. 2004), amastigotes fijados y sonicados (Araujo and Guptill 1984, Pan and McMahon-Pratt 1989), proteínas recombinantes (Almeida, Covas et al. 1997, Umezawa, Bastos et al. 1999, Saez-Alquezar, Sabino et al. 2000, da Silveira, Umezawa et al. 2001, Gadelha, Vercosa et al. 2003, De Marchi, Di Noia et al. 2011, Longhi, Brandariz et al. 2012), y antígenos excretados/secretados de epimastigotes (antígenos ESEA) (Figueroa-Lara 2009) y tripomastigotes (antígenos TESA) (**Figura 7**). Estos últimos han demostrado ser buenos candidatos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en pruebas de ELISA y *Western blot* debido a su elevada sensibilidad y especificidad (Umezawa, Nascimento et al. 2001, Berrizbietia, Ndao et al. 2004, Berrizbeitia, Ndao et al. 2006, Umezawa, Souza et al. 2009, Nagarkatti, de Araujo et al. 2014).

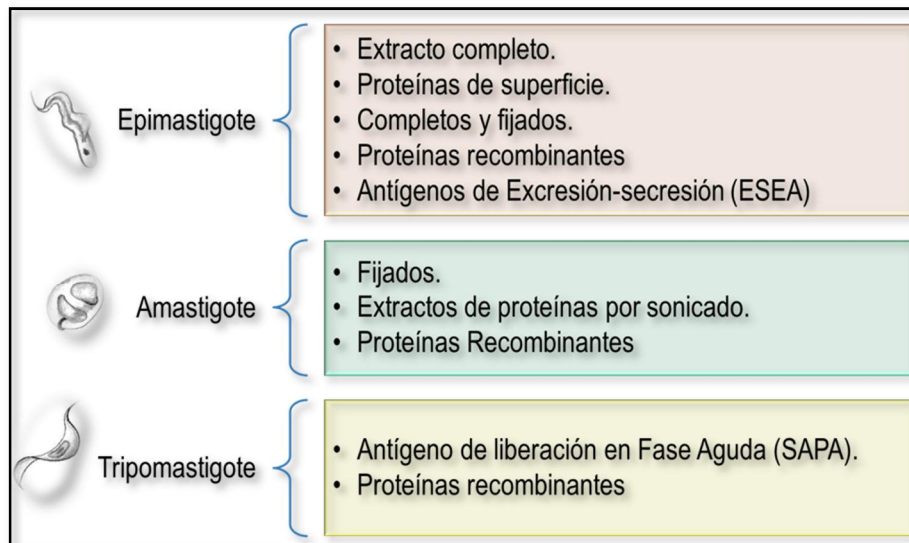


Figura 7. Origen biológico de antígenos de *T. cruzi* que han sido evaluados con sueros humanos.

Los antígenos del parásito que han sido evaluados como biomarcadores para identificar anticuerpos humanos contra el parásito tienen distinto origen biológico, se han utilizado desde parásitos completo, extractos de proteínas totales hasta antígenos recombinantes o fracciones celulares.

Dada la complejidad que implica homogenizar el diagnóstico para la enfermedad de Chagas, la Organización Mundial de la Salud estableció criterios para permitir el uso de pruebas serológicas comerciales en los centros estatales de diagnóstico, debido a las ventajas técnicas que estos kits ofrecen. Estos criterios se basan principalmente en las normas de elaboración, validación y reproducibilidad que deben cumplirse para que el ensayo sea eficiente. Para que estos criterios puedan cumplirse es necesario contar con un panel de muestras de validación, que cuente con sueros positivos y negativos a la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* con distintos grados de reactividad y que provengan de distintas regiones geográficas (WHO 2007).

Este parece ser un aspecto importante que impacta en las pruebas diagnósticas puesto que existen reportes que indican que el uso de antígenos de distinto origen geográfico muestra variaciones en los resultados (Bongertz and Dvorak 1983, WHO 2007). Se ha reportado que el origen geográfico del antígeno influye en la eficiencia de detección de las pruebas diagnósticas, debido a que *T. cruzi* presenta una alta variabilidad genética que conlleva a variaciones biológicas, bioquímicas, antigénicas y moleculares entre las distintas cepas del parásito (Miles, Cedillos et al. 1981, Andrade 1985, Di Noia, Buscaglia et al. 2002, Zingales, Andrade et al. 2009). Además, se ha podido relacionar la distribución geográfica con las diferencias patológicas de las cepas del parásito y con la DTU a la que pertenecen (Zingales, Miles et al. 2012)

La variación de antígenos relacionada con la DTU fue evidenciada por primera vez con la identificación de dos isoformas de una proteína antigénica presente en la superficie en tripomastigotes denominadas TSSAI y TSSAII (*Trypomastigote Small Surface Antigen*). Se pudo establecer que las poblaciones del parásito pertenecientes a TcI, TcIII y TcIV cuentan con el alelo que codifica para TSSAI, mientras que TcII, TcV y TcVI presentan el alelo codificante para TSSAII (Di Noia, Buscaglia et al. 2002, Risso, Garbarino et al. 2004, Bhattacharyya, Brooks et al. 2010). Otra característica importante de estos antígenos es que no presentaban reacción cruzada al realizar ensayos serológicos, lo que permite la obtención de un diagnóstico diferencial entre las DTU's, sugiriendo a TSSA como el primer marcador inmunológico de los linajes genéticos de *T.*

cruzi, pudiendo correlacionar la infección humana por los linajes descritos en Sudamérica (Di Noia, Buscaglia et al. 2002, Risso, Garbarino et al. 2004, Zingales, Miles et al. 2012).

En México un reporte realizado en Puebla probó que se pueden detectar mayores niveles de anticuerpos usando como antígeno los extractos de proteínas provenientes de cepas aisladas en la misma comunidad donde se llevó a cabo el estudio, contrastando con los bajos niveles de anticuerpos observados al usar un antígeno comercial (Chagastest-Wiener Laboratories Group, Rosario, Argentina) (Pérez-Fuentes, D. C. Sánchez-Guillén et al. 1998).

Posteriormente Sánchez y colaboradores señalaron la importancia de usar antígenos de cepas aisladas en México, indicando que los ensayos que utilizan antígenos comerciales de otros países son menos sensibles para la detección de pacientes chagásicos en la República Mexicana (Sanchez, Monteon et al. 2001). Además, esta baja sensibilidad (empleando antígeno comercial para ELISA proveniente de Argentina) no permitió distinguir entre sueros provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos crónicos, a diferencia de los antígenos autóctonos que si lo permitieron (Sanchez, Monteon et al. 2001).

Una posible explicación es que se sabe que las muestras de sueros de individuos infectados con el parásito provenientes de la región amazónica, en donde regularmente se observan bajos niveles de parasitemia, títulos de anticuerpos cercanos al nivel de corte y presencia del linaje TcI, el diagnóstico es particularmente difícil. TcI es el linaje predominantemente en México y aunque se ha reportado la presencia de otros linajes (TcII, TcIII, TcIV y TcV) estos están en mucho menor proporción y confinados solo a algunas regiones del país (Bosseno, Barnabé et al. 2002, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Bosseno, Barnabe et al. 2009, Ramos-Ligonio, Torres-Montero et al. 2012), a diferencia de Sudamérica en donde existe una amplia presencia de todos los DTU's (Zingales, Miles et al. 2012).

Las instituciones de Salud en México establecen que la selección de las pruebas de sero-diagnóstico para la infección por *T. cruzi* depende de la relación costo/beneficio y del tipo de antígenos y conjugado utilizados. El 64% de los laboratorios de la RNLSP

(Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública) utiliza antígenos recombinantes, el 96% antígenos crudos y el 7% parásito Íntegro (InDRE 2015), de cepas propias de diferentes países de Sudamérica. En diversos trabajos se ha mostrado que estos kits presentan distintos grados de sensibilidad y especificidad cuando se utilizan sueros de individuos provenientes de Sudamérica (Oelemann, Teixeira et al. 1998, Sanchez, Monteon et al. 2001, Briceno, Rodriguez et al. 2010, De Marchi, Di Noia et al. 2011, OMS 2017) y un número aún mayor de muestras indeterminadas y falsos negativos en muestras de sangre provenientes de México (WHO, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

Trypanosoma cruzi presenta una gran variabilidad genética por lo que se ha clasificado en 6 diferentes DTUs, los cuales muestran distintas características geográficas, biológicas, moleculares, patogénicas y antigénicas. Se considera que esta heterogeneidad es un posible factor implicado en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad y que su estudio es importante para entender la eco-epidemiología de la enfermedad de Chagas. A pesar de ello, son muy pocas las cepas de *T. cruzi* que han sido aisladas y/o caracterizadas en México.

IV. HIPÓTESIS

Distintos aislados de *T. cruzi* obtenidos de Oaxaca, un estado altamente endémico de la enfermedad de Chagas en México, tienen características biológicas, moleculares y antigénicas distintas entre sí.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar biológicamente, genotipificar e identificar el perfil antigénico de cepas de *T. cruzi* aisladas en el Estado de Oaxaca.

5.2. Objetivos particulares

1. Aislar, caracterizar biológicamente y molecularmente cultivos de *T. cruzi* a partir de las heces de su vector triatomino capturados en el Estado de Oaxaca, México.
2. Identificar el perfil antigénico de los aislados obtenidos.
3. Determinar mediante análisis *in silico* la identidad de los antígenos detectados.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

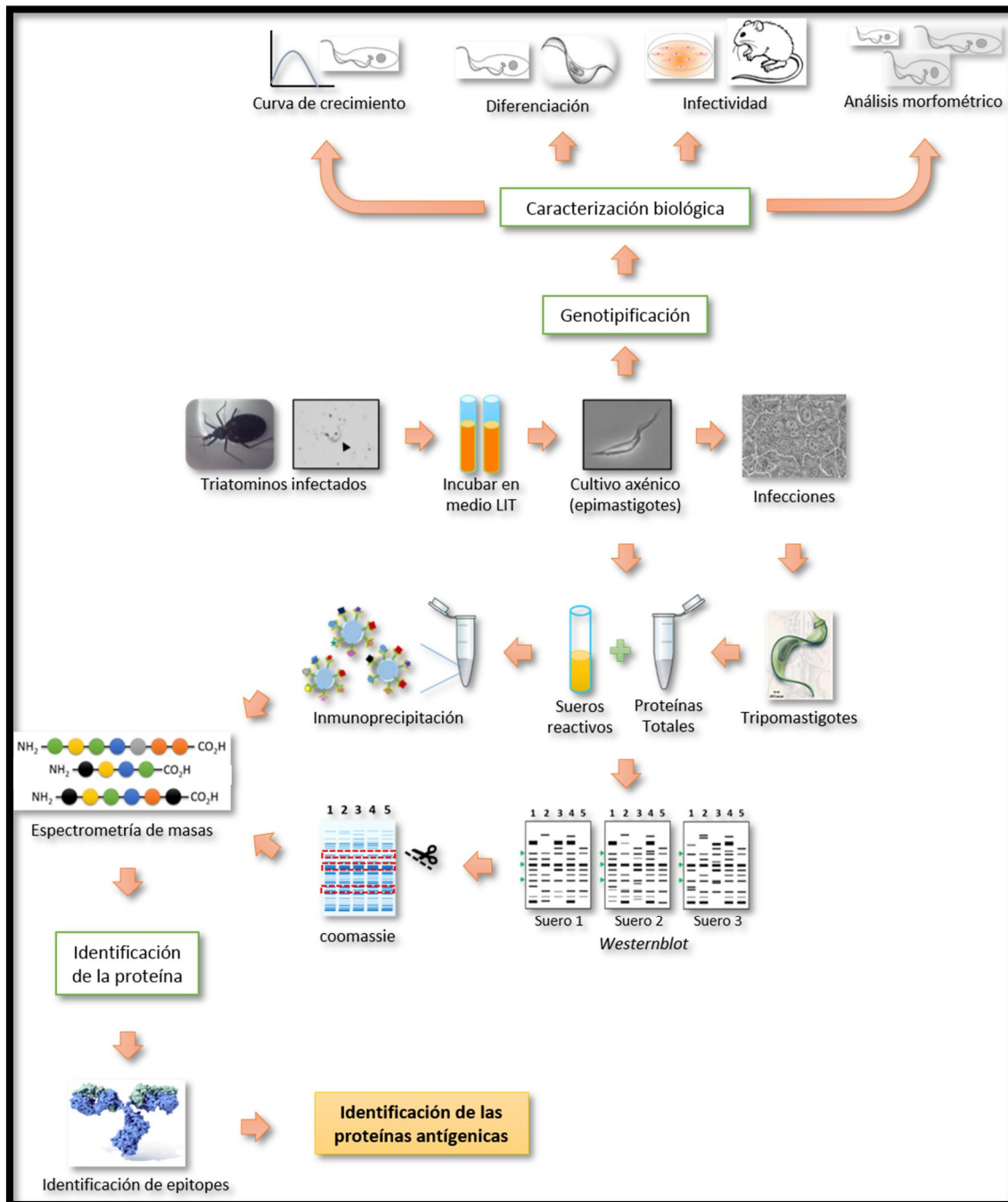


Figura 8. Estrategia experimental.

Para el desarrollo de este trabajo utilizaremos 15 aislados de *T. cruzi* obtenidos a partir de heces de triatominos infectados capturados en el Estado de Oaxaca, siete de

los cuales fueron obtenidos y caracterizados biológica y molecularmente en un trabajo previo (Martínez-Cuevas, 2013 tesis de maestría) y ocho fueron obtenidos en este trabajo en el primer año de su desarrollo. Además, como controles utilizamos las cepas de referencia CI-Brenner e Y.

Como fueron evaluados todos los aislados y cepas de referencia por ensayos de *Western blot*, para el tamizado de las proteínas antigénicas y conservadas, se requería de utilizar gran cantidad de suero de individuos sero-positivos a *T. cruzi*. La forma ideal de contar con la cantidad de suero necesaria es de unidades de sangre para transfusión, que al ser positivas a la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* se destinan a su destrucción o a donación para fines de investigación, cuando estas son solicitadas por las vías adecuadas como las utilizadas en este trabajo de investigación.

La detección de las proteínas antigénicas del parásito se realizó mediante dos técnicas: un ensayo de *western blot* (WB) y un ensayo de Inmunoprecipitación (IP) usando extractos de proteínas totales individuales de tripomastigotes de los aislados obtenidos provenientes de infecciones de cultivos celulares de células LLC-MK2. En el caso del WB se utilizó los extractos proteicos individuales y por separado de los aislados y cepas de referencia a analizar mientras que en el caso del IP se utilizó una mezcla de los extractos proteicos de todos los aislados. Como anticuerpo se utilizó IgG totales presentes en los sueros de humano reactivos a *T. cruzi*. Adicionalmente se realizaron ensayos control en ambas técnicas (WB e IP) usando sueros humanos no reactivos al parásito.

Para determinar las proteínas antigénicas en los ensayos de WB se seleccionaron aquellas bandas en las que se observó el mismo patrón de reconocimiento en todos los extractos de proteínas de los aislados e identificadas por todos los sueros utilizados. A partir de un gel de proteínas paralelo teñido con azul de Coomasie se cortaron aquellas bandas del mismo peso molecular donde se encontraban las proteínas candidato para su posterior análisis de secuenciación por espectrometría de masas (MS-MS). En el caso del ensayo IP, se mandaron a analizar mediante MS-MS todas las proteínas que fueron IP por los anticuerpos presentes en los sueros utilizados. Mediante un ensayo *in silico* se determinó la identidad de las proteínas reconocidas por los sueros humanos reactivos a

T. cruzi, así como la búsqueda de epítopos que permitan identificar a las proteínas antigénicas para estudios posteriores.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Parásitos

Se utilizaron cultivos de parásitos de *T. cruzi* obtenidos a partir de las heces de triatomos infectados con *T. cruzi* aislados en un trabajo previo (Martínez-Cuevas, 2013) y durante este trabajo (**Tabla 1**), así como cepas control ya reportadas en la literatura (**Tabla 2**). Para el mantenimiento de los cultivos se usó un inóculo de 0.5 ml de un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica por cada 5 ml de medio LIT (*Liver Infusion tryptose*) (NaCl 60mM; KCl 5.36 mM; Na₂HPO₄ 29 mM; C₆H₂O₆ 11 mM; SFB al 1/10 v/v; hemina 7.6 mM, penicilina 13 mM, estreptomycin 10 mM) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) incubados a 27°C (Camargo 1964). En estas condiciones los parásitos se sembraron cada 7 días manteniendo el stock en fase logarítmica para uso experimental.

Tabla 1. Aislados de parásitos. Aislados de *T. cruzi* que serán utilizados para la realización de este trabajo.

NOMENCLATURA	ABREV.	REGIÓN	DTU	REFERENCIA
TcOAX-IST-SC1-TphM	SC1	Istmo	Tcl y TcV	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-IST-SC2-TphM	SC2	Istmo	Tcl y TcV	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-SC3-TphM	SC3	Istmo	Tcl y TcV	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-SC4-TphM	SC4	Istmo	Tcl	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-TE1-TphM	TE1	Istmo	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-IST-CI1-TphH	CI1	Istmo	Tcl	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-CI2-TphM	CI2	Istmo	Tcl	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-CI3-TphM	CI3	Istmo	Tcl y TcV	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-IST-CI4-TphM	CI4	Istmo	Tcl y TcV	Obtenida en este trabajo.
TcOAX-SSU-NM1-Tsp3	NM1	Sierra Sur	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-SSU-NM2-Tsp3	NM2	Sierra Sur	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-SSU-NM3-Tsp3	NM3	Sierra Sur	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-SSU-NM4-Tsp3	NM4	Sierra Sur	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría
TcOAX-SSU-NM5-Tsp3	NM5	Sierra Sur	TcV	Obtenido en este trabajo.
TcOAX-VCE-SS3-Tsp2	SS3	Valles Centrales	Tcl	(Martínez Cuevas 2013); tesis de maestría

Tabla 2. Cepas de parásitos. Cepas de *T. cruzi* que fueron utilizadas como control en este trabajo para la caracterización biológica y/o molecular.

Cepa	Descripción	Referencia
Cl Brener	Cepa de referencia para el proyecto genoma de <i>T. cruzi</i> . TcVI.	(Zingales, Andrade et al. 2009)
Y	Referencia para TcII.	(Zingales, Andrade et al. 2009)

7.2. Cultivos celulares

Se utilizaron monocapas al 70% de confluencia de las siguientes líneas celulares: fibroblastos de embrión de ratón 3T3 NIH (ATCC® CLR-1658™), fibroblastos de humano HFF-1 (ATCC® CSCR-1041™) y células epiteliales de macaco LLC-MK2 (ATCC® CCL-7.1™) mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alta glucosa (Gibco life technologies 12100-061) suplementada al 10% de SFB que se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

7.3. Modelo animal

Durante el desarrollo de este proyecto trabajamos con ratones hembras de 4-6 semanas de nacidos. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12 horas luz-oscuridad bajo temperatura, humedad, agua y alimentos adecuados según las recomendaciones y criterios establecidos por el comité de ética de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Cinvestav (UPEAL-Cinvestav-IPN) y la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

7.4. Sueros e identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi*

Cincuenta y nueve sueros de humanos reactivos a *T. cruzi* y 53 sueros no reactivos fueron utilizados durante el desarrollo de este trabajo, los sueros fueron donados por el Centro de Transfusión Sanguínea Estatal del Estado de Oaxaca, y del laboratorio 13 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca

(UABJO), por el Dr. Luis Alberto Hernández Osorio. Una muestra representativa de los sueros fue evaluada para confirmar la reactividad, o no reactividad, de los sueros al parásito. Para la evaluación de los sueros se utilizaron 3 ensayos que se aplican en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), que es la institución de referencia de Salud Pública nacional. Las técnicas aplicadas consistieron en un ELISA comercial (Test ELISA CHAGAS III/GrupoBios-BiosChile® 1300442), Elisa Casero con extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas Y, Querétaro, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) usando una mezcla de cepas mexicana (InDRE), *western blot* usando extractos de proteínas totales de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas Querétaro, NM1-cl1, Y y CL Brener. Además, las muestras fueron analizadas por PCR, amplificando dos secuencias especie-específicas de *T. cruzi* (región intergénica del miniexón y secuencia repetida intergénica C6).

7.5. Aislamiento y axenización del cultivo de parásitos

Una muestra de heces de triatomíneos positivas a *T. cruzi* al microscopio, se colocaron en medio LIT complementado con 10% de SFB y adicionado con un coctel de antibióticos y un antimicótico para asegurar la axenización del cultivo (estreptomina 10 mM, lincomicina 20 mM; ampicilina 20mM; flurocitosina 0.03 mM) a 27°C (Camargo 1964). Los cultivos fueron observados al microscopio cada 7 días hasta observar únicamente las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico del parásito en el cultivo. Con el fin de garantizar la axenización del cultivo, se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo y fueron sembrados en 1 ml de medio LB (Luria-Bertani) que se incubaron por 48 horas a 32°C en agitación constante. De los cultivos donde no se observó crecimiento bacteriano, se tomó una alícuota que fue observada al microscopio para identificar la presencia de algún microorganismo. Una vez que los cultivos de parásitos se encontraban axénicos fueron mantenidos en medio LIT complementado con 10% SFB a una temperatura de 27°C realizando resiembras cada 7 días, para el mantenimiento del stock y para la obtención de cultivos para uso experimental.

7.5.1. Nomenclatura de los aislados

Con el objetivo de tener un control adecuado de los aislados obtenidos, así como la fácil identificación de las características de aislamiento principales, se usará una nomenclatura arbitraria establecida en el laboratorio previamente (Martínez-Cuevas, 2013). Para nombrarlos seguimos los siguientes criterios, primero se antepone el prefijo Tc haciendo referencia a que es un cultivo de *T. cruzi* seguido por las siguientes características:

1. Las tres siglas representativas del Estado de procedencia del aislado.
2. Las tres siglas más representativas de la región de procedencia del aislado.
3. Las dos siglas más representativas del municipio de procedencia del aislado, así como el número de aislado correspondiente a los obtenidos en dicho municipio.
4. Se tomaron en cuenta las tres siglas más representativas del nombre científico del vector, seguido de una sigla que represente el sexo del espécimen.

7.6. Obtención de tripomastigotes

Se obtuvieron tripomastigotes a partir de infecciones celulares en monocapas al 70% de confluencia de células epiteliales de macaco LLC-MK2 (ATCC® CCL-7.1™). Primero se realizaron infecciones primarias en cajas de cultivo de 75 cm² con 3x10⁸ epimastigotes/ml en medio DMEM al 2% con SFB y mantenidas a 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂. Se realizaron dos lavados con medio DMEM sin complementar para retirar todos los epimastigotes libres en el sobrenadante a las 24 y 48 horas. Se realizó el cambio de medio cada 48 horas posteriores a los lavados. Una vez que se observó liberación de tripomastigotes al medio extracelular los sobrenadantes fueron rescatados en tubos para cultivo de 50 ml. Los sobrenadantes fueron centrifugados durante 2 min a 2500 rpm, se incubaron durante 1 h para mantener los restos celulares en el precipitado del tubo y la liberación de los tripomastigotes al medio. Se desecharon las pastillas, y los sobrenadantes fueron centrifugados por 7 min a 3500 rpm, los tripomastigotes obtenidos en este punto fueron utilizados para realizar nuevas infecciones o lavados y mantenidos a -70°C hasta su uso para la extracción de proteínas.

7.7. Extracción de ADN

El ADN de epimastigotes de los aislados y las cepas de referencia se purificó a partir de 1×10^9 parásitos/ml en fase logarítmica como se describe a continuación. Los parásitos se obtuvieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, la pastilla se lavó dos veces con PBS 1* y las células se re-suspendieron en 400 μ L de solución GUISCN (Isocianato de Guanidina 0.4 M, Citrato de Sodio 1mM, Sarcosil 0.5 mM, mercaptoetanol 5.4 mM). Se adicionaron 600 μ L de etanol frío al 80% para obtener una red de ADN la cual se lavó dos veces con etanol al 70%, la red de ADN se re-suspendió en TE (Tris-EDTA) (Tris-HCl 50mM, EDTA 10 mM, RNasa A 100 μ g/ml). Se adicionaron 500 μ L de Buffer de proteínasa K (Tris-HCl 20mM, 10mM EDTA, SDS 5mM), 100 μ g de Proteínasa K (Sigma Aldrich P4850) y 60 μ g de RNasa (Sigma Aldrich R4642) y se incubaron a 37°C por 1 hora. El ADN se extrajo dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1 v/v, Sigma Aldrich 77617) se centrifugaron a 13 rpm durante 3 min para recuperar la fase acuosa, después se realizaron dos extracciones con cloroformo:alcohol isoamilico (24:1 v/v, Sigma Aldrich 25666). Se obtuvo la fase acuosa y se adicionó NaAoc 3M (1:10 v/v) y 2 volúmenes de etanol absoluto. La red de ADN que se formó al final se recuperó y finalmente se re-suspendió en TE (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0), los ADN fueron almacenados y mantenidos a -20°C hasta su uso.

7.8. Caracterización biológica y genotipificación

7.8.1. Genotipificación

Para realizar la genotipificación de los aislados primero se determinó la especie usando oligonucleótidos de la secuencia especie-específica C6 que es un elemento repetido nuclear (**Tabla 3**) (Araya, Cano et al. 1997). Para la identificación de la DTU a la que pertenecen los parásitos aislados se realizaron una serie de amplificaciones mediante PCR. Primero se realizó la amplificación de la región intergénica del miniexón con los oligonucleótidos TC, TC1 y TC2 (Souto, Fernandes et al. 1996), que con un producto de amplificación de 350 pb discrimina a Tc1 del resto de las DTU, se obtiene un

amplicón de 300 pb para TcII, TcV y TcVI, o la ausencia de producto de amplificación para TcIII y TcIV. Posteriormente, en el caso de que con esta primera amplificación no se pueda determinar el genotipo del parásito, se amplifica el dominio divergente D7 del gen 24S α ARNr con los oligonucleótidos D71 y D72 (Souto and Zingales 1993), que permite identificar a TcIII (amplicón de 110 pb), TcIV (amplicón de 125, 130 o 165 pb) y TcV (amplicones de 110 y 125 pb) de TcII y TcVI (una banda de 125 pb). Finalmente amplificamos el dominio de tamaño variable del gen 18S ARNr usando los oligos V1 y V2 (**Tabla 3**) (Clark and Pung 1994), para discriminar entre los DTUs II (con un producto de 165 pb) y VI (que no se obtiene producto).

Para cada una de las reacciones se usó 10 ng de ADN genómico, con 2.5 U de Taq polimerasa, Buffer de Taq polimerasa 10* (10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl, 5.0 mM MgCl₂), 0.5 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos y 0.4 μ M de cada oligonucleótido para un volumen final de 20 μ L de la reacción.

Las condiciones térmicas para amplificar la secuencia C6 fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 5 min. por un ciclo, 1 min. a 94°C, alineamiento 1 min. a 60°C y extensión 1 min. a 72°C (repetido 30 veces), con una elongación final de 5 min. a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% con TBE 0.5* (0.045 M tris-borato, 1 mM EDTA pH 8.0). Para correr las muestras de ADN se usó un buffer de corrida 2* (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% xilencianol 0.25%) V/V y un marcador de peso molecular de 1 Plus DNA Leader (Invitrogen™).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de los aislados.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	AMPLICIÓN	REF.
C6 S (sentido)	5'-GATGCGCATTGTTACGA-3'	330 pb	(Araya, Cano et al. 1997)
C6 AS (antisentido)	5'-CTGGCTGGCCTTGTATCC-3'		
TC	5'-CCCCCCTCCCAGGCCACACTG-3'	300 o 350 pb	(Souto, Fernandes et al. 1996)
TC1	5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3'		
TC2	5'-CCTGCAGGCACACGTGGTTGTG-3'		
D71	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	110, 120, 125 o 130 pb	(Souto and Zingales 1993)
D72	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'		
V1	5'-CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA-3'	165 pb	(Clark and Pung 1994)
V2	5'-TTGAGGGAAGGCATGACACATGT-3'		

Las condiciones térmicas de PCR para las muestras de ADN (1 ng) usando los oligonucleótidos TC, TC1, TC2 será de 27 ciclos de amplificación: 94°C durante 30s, alineamiento 30s a 55°C y extensión 30s a 72°C, seguido por una elongación final de 5 min. a 72°C. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, usando el buffer de corrida 6* (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% xilencianol 0.25%) y un marcador de peso molecular de 1 Kb Plus ADN Leader (Invitrogen™).

El perfil de amplificación de los oligonucleótidos D71 y D72 fue de 30 ciclos de amplificación: 1 min. a 94°C, alineamiento 1 min. a 60°C y extensión 1 min. a 72°C, seguido por una elongación final de 5 min. a 72°C. Los productos de amplificación se corrieron en geles de poliacrilamida 5%, usando como buffer de corrida orange 6* (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15% orange G, 0.03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA) y el marcador O'Gene Ruler Low Range DNA Ladder de 25 bp (Thermo Scientific). El tiempo de corrida para estos geles fue de 2:30 h. a 80 V y 400 mA.

Por último, las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos V1 y V2 fueron: 1 minuto a 94°C, un minuto a 50°C, y un minuto a 72°C, seguido por una elongación final a de 5 min a 72°C y los productos de la amplificación de la secuencia 18S ARNr se separaron en geles de agarosa al 1.5%. Para correr las muestras de ADN se usó el buffer de corrida 6X (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% xilencianol 0.25%) y un marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™).

Todos los geles de corrida de ADN fueron teñidos con Bromuro de etidio para ser vistos con luz Ultravioleta y la imagen fue capturada utilizando el software DNR *Bio Imaging system*.

7.8.2. Curva de crecimiento.

Se usaron cultivos con un inóculo inicial de 1×10^6 epimastigotes/ml en fase logarítmica de los aislados y las cepas control Y y CL Brener mantenidos en medio LIT complementado con 10% de SFB, 0.5 % de penicilina/ estreptomicina y 1% de hemina (5mg/ml) incubados a 27°C (Camargo 1964). Se realizó un conteo en cámara de Neubauer cada 24 horas, usando como medio de exclusión Azul de tripano para descartar las células muertas que presentaron permeabilidad en su membrana lo que permite el paso del colorante hacia el interior celular.

7.8.3. Curvas de transformación

Para evaluar la capacidad de transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos de los aislados y las cepas control Y y CL Brener, se usaron epimastigotes provenientes de cultivos con 15 días de envejecimiento mantenidos en medio LIT. Los cultivos se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y fueron lavados con PBS 1*. Después los parásitos se re-suspendieron en medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) (NaCl 190mM, KCl 17mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM, buffer de fosfato 8mM pH 6.0) y se mantuvieron a 27°C durante dos horas. Posteriormente los parásitos se diluyeron a una concentración final de 5×10^5 epimastigotes/ml en medio TAU3AAG, (NaCl 190mM, KCl 17mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM, buffer de fosfato 8mM pH 6.0, bicarbonato de sodio 0.35%, L-prolina 10mM, L-glutamato de sodio 50mM, L-aspartato de sodio 2mM y glucosa 10mM) y fueron mantenidos a 27°C en cajas Petri de 1.2 cm de diámetro. Se evaluaron diariamente el porcentaje de formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico en 5 campos al azar observados al microscopio óptico a 40* durante 8 días (Contreras, Salles et al. 1985).

También se evaluó la capacidad de transformación de las formas de epimastigote a tripomastigotes y amastigote en el sobrenadante de un cultivo celular. Para ello se usaron cultivos celulares de fibroblastos 3T3 NIH que se pusieron a interactuar durante 48 horas con 2×10^5 epimastigotes/ml en medio DMEM al 2% de SFB. El porcentaje de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes fueron evaluados cada 24 horas bajo el microscopio y calculada la eficiencia de transformación.

7.8.4. Análisis morfométrico

Se evaluaron las características morfológicas de los parásitos en su forma de epimastigotes. Para ello se fijaron 1×10^6 parásitos/ml en 200 μ L de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos, se colocó una alícuota de 10 μ L en un portaobjetos, posteriormente se permeabilizaron los parásitos con 50 μ l metanol y se tiñeron con 100 μ l de la tinción de Giemsa (Hycel Cat. no. 6303) durante 45 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con agua bidestilada y un lavado al chorro de agua. Finalmente, se realizaron mediciones del largo del cuerpo del parásito sin el flagelo, largo del flagelo, longitud total y ancho de 25 epimastigotes utilizando el programa *Image-Pro Plus V 6.0*.

7.8.5. Análisis *in vitro* de la capacidad infectiva

Para evaluar la capacidad infectiva de los aislados se infectaron 2×10^4 fibroblastos de humano HFF-1 (ATCC[®] CSCR-1041TM) crecidos sobre cubreobjetos, (22x22 mm) con 2×10^5 tripomastigotes derivados de cultivos celulares de cada uno de los aislados y de las cepas de referencia Y y CL Brener en medio DMEM al 2% con SFB a 37°C y 5% de CO₂. Dos horas después de interacción de las células y los tripomastigotes, los cultivos celulares fueron lavados con medio DMEM sin complementar, 18 horas después los cubreobjetos fueron rescatados y las células teñidas con 0.05 0.5 μ g/ml DAPI (Sigma-Aldrich D8417) y montados en un portaobjetos con VECTASHIELD para ser observadas al microscopio invertido, y realizar el conteo del número de células infectadas observando 5 campos al azar usando el software *Image-Pro Plus V 6.0*.

7.8.6. Análisis *in vivo* de la capacidad infectiva

Para la infección *in vivo* se inocularon grupos de tres ratones Balb/c por vía intraperitoneal con 1×10^5 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de cada una de las cepas aisladas, así como de los controles Y y CL Brener. Se evaluaron las parasitemias durante 45 días mediante la observación de las formas de tripomastigote liberadas al torrente sanguíneo tomando una muestra de 40 μL de sangre obtenida de la parte distal de la cola de los ratones. La muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se contó la cantidad de tripomastigotes en 10 μL de suero en una cámara de Neubauer.

Durante la parasitemia se evaluaron las etapas que caracterizan a una infección tales como el período pre-patente, que es el período que transcurre desde la inoculación del patógeno hasta el momento en que es posible detectarlo. El período patente, período en el que es posible detectar al parásito y finalmente el período subpatente, que es cuando declina la parasitemia y ya no es posible detectar la parasitemia.

7.9. Extracción de proteínas

Se trabajaron extractos de proteínas totales de epimastigotes en fase logarítmica y tripomastigotes derivados de cultivo celular. Ambas muestras fueron tratadas 30 min a 4°C con 500 μL de buffer de lisis (Imidazol 20 mM pH 6.8, NaCl 100 mM, CaCl_2 2 mM, triton-X100 1%, NaN_3 0.04%, Inhibidores de proteasa 1x Complete-EDTA free/Roche Ref. 11873580001), y pipeteadas constantemente para homogeneizar la muestra y permitir la correcta extracción de proteínas totales. Posteriormente las proteínas fueron cuantificadas como se señala a continuación.

7.10. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método BCA (*Bicinchoninic Acid*) con el kit para cuantificación de proteínas Pierce™ BCA *Protein Assay* (Thermo Scientific #23225) usando las especificaciones del proveedor.

7.11. SDS-PAGE

Los extractos de proteínas totales de los parásitos lisados se mezclaron 1:3 con buffer de muestra 3x (Tris 200 mM pH 6.8, SDS 6%, glicerol 30%, Ditiotreitól 150 mM y una pizca de azul de bromofenol), posteriormente se calentaron a ebullición durante 10 minutos. Una vez que las muestras fueron desnaturalizadas se cargaron y corrieron en cámaras *mini-protean III Cell* (Bio-Rad, 165-3301) utilizando el gel separador al 10% y un gel concentrador al 5% con buffer desnaturalizante (glicina 0.19 M, Tris-OH 24.92 mM, SDS 3.5 mM) a 80 v y 400 mA durante 2 horas. Los geles de acrilamida fueron teñidos con azul de coomassie para su visualización y la imagen fue capturada utilizando el software DNR *Bio Imaging system*.

7.12. Western blot

Para la identificación de las proteínas antigénicas reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros reactivos a *T. cruzi*, se corrieron 400 µg de proteínas totales de epimastigotes o tripomastigotes en geles preparativos. Las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida fueron electro-transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, 162-0115) en buffer de transferencia (Tris-OH 24.9 mM, glicina 0.2 M, metanol 4%) a 100 V por 1:10 h en cámara de hielo. Para confirmar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta fue teñida con rojo Ponceau por 5 min (rojo Ponceau S 0.1%, ácido acético 5%). La membrana se destiñó con agua bidestilada para conservar las bandas, y con PBS 1x para destañir completamente.

Una vez que se observó la transferencia de las proteínas las membranas fueron cortadas en tiras de 2 mm y bloqueadas a 4°C *Over Night* (ON) con la solución de bloqueo (TBS 1x: NaCl 136 mM, Tris-base 20 mM, pH7.6; Tween 20 al 0.1%; leche svelty-Nestle® al 10%). Después la membrana se lavó dos veces con TBS 1x-Tween 20 0.1% cada lavado por 10 min. La membrana se incubó por 2 h con sueros humanos reactivos o no reactivos al parásito, en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron tres lavados de 10 min con TBS 1x-Tween 20 al 0.1% y se incubó la membrana con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de

humano conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, sc-2453) disuelto 1:15000 en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron tres lavados con TBS 1x-Tween 20 al 0.1%, cada lavado de 10 min, después las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando dos métodos. En uno de ellos se utilizó el reactivo ECL (Amersham, RPN2106) como sustrato de la peroxidasa y fueron observadas mediante el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). El segundo método de revelado consistió en utilizar un kit de sustrato conjugado de fosfatasa alcalina (BioRad Kit #1706432) basado en colorimetría, la imagen fue capturada con el sistema DNR *Bio Imaging system*.

7.13. Ensayo de Inmunoprecipitación

Para identificar las proteínas antigénicas que son reconocidas por los anticuerpos IgG presentes en los sueros humanos que fueron reactivos al parásito, se utilizaron perlas magnéticas acopladas a proteína G siguiendo las especificaciones de proveedor (Thermo Fisher 10007D). Primeramente, se realizó la unión de los anticuerpos IgG de humano a las perlas incubando durante 1 hora y en agitación constante 1.5 mg de perlas con 10 µl de una mezcla de 59 sueros humanos reactivos a *T. cruzi* en un volumen final de 200 µl en PBS1x-Tween 20 al 0.02%. Se realizaron 2 lavados con solución de lavado y con ayuda de un magneto que permitió la obtención de las perlas magnéticas de proteína G unida a los IgG. Para formar el complejo Anticuerpo-Antígeno se incubaron las perlas unidas a los anticuerpos durante 1 hora con 500 µg de una mezcla 1:1 de los extractos de proteínas totales de cada uno de los aislados en 200 µl de PBS1x-Tween 20 al 0.02%, y mantenidas en agitación constante. Después se realizaron 3 lavados con la solución de lavado como se mencionó anteriormente, para obtener las proteínas que se unieron a los anticuerpos se utilizaron 10 µl de buffer de elución (proporcionado en el kit) que permite la separación del complejo Antígeno-Anticuerpo, el buffer de elución se rescató en un nuevo tubo y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de coomassie.

El mismo procedimiento se realizó con 3 sueros no reactivos a *T. cruzi* que fueron utilizados como control para descartar aquellas proteínas que se unieran inespecíficamente a las perlas o que pudieran causar reacción cruzada con proteínas de otros organismos.

7.14. Identificación de las proteínas inmunogénicas

Con el fin de identificar las proteínas inmunogénicas que fueron reconocidas en los ensayos de *western blot* (WB) e inmunoprecipitación (IP), las muestras se procesaron para ser analizadas mediante espectrometría de masas (MS). Para ello se corrieron 37 µg de una mezcla de proteínas totales de tripomastigotes en geles de poliacrilamida que fue teñido con azul de coomassie para identificar por peso molecular aquellas bandas conservadas y de mayor reconocimiento en el WB, mientras que en el caso de la IP se corrió el producto de IP en geles de poliacrilamida, los carriles completos fueron cortados en siete fragmentos, que facilitará la identificación de proteínas, ya que éstas se concentran en el gel por peso molecular. El análisis de Espectrometría de masas se realizó en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólmica del Cinvestav, en la unidad Zacatenco, mediante dos técnicas: MS-Maldi-TOF/TOF y mediante ionización por electrospray (MS-ESI).

7.15. Análisis predictivo de epítomos

El análisis predictivo de epítomos, para evaluar determinantes antigénicos que sean reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros humanos reactivos al parásito, se utilizó el servidor ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>), que se basa en la predicción de epítomos de células B en una secuencia antigénica, utilizando una red neuronal artificial. Este servidor permite identificar epítomos lineales, es decir, epítomos basados en la secuencia primaria de la proteína.

7.16. Técnica de ELISA

Como se mencionó anteriormente, los sueros utilizados para la realización de este trabajo fueron evaluados como reactivos o no reactivos al parásito, por tanto, uno de los ensayos que se realizaron con este fin fue la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) casera y con un kit comercial. En el caso de ELISA casero se utilizaron proteínas totales de epimastigotes y tripomastigotes de cepas de referencia que han sido utilizadas en trabajos previos tanto a nivel nacional (cepa Querétaro, referencia) como a nivel Latinoamérica (cepa Y, referencia). Se inmovilizaron extractos de proteínas totales del parásito en el fondo de placas de 96 pozos *high binding* con 50 µl de buffer de carbonatos (34 mM NaHCO₃ y 16 mM Na₂CO₃, pH 9.6) toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con 200 µl PBS 1X-tween 20 0.1%, para ser bloqueadas posteriormente durante 1hr a 37°C con solución de bloqueo (PBS 1x, Tween 20 al 0.1%; *Bovine serum albumin* (BSA) al 5%). Se lavó 3 veces con PBS1x Tween 20 al 0.1% y se incubó 2 horas con sueros reactivos a una dilución 1:50 con solución de bloqueo en cámara húmeda, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0.1%. Se adicionó el segundo anticuerpo (anti-IgG humano acoplado a peroxidasa) 1:1000 en PBS 1x-Tween 20 al 0.1% durante 1 h a 37 °C y se lavó cinco veces con PBS-Tween 0.1%. La reacción fue revelada con *O-phenylenediamine* y peróxido 0.25 % como sustrato, que se dejó actuando 15 min a 37° C, finalmente la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N y los valores de absorbancia fueron leídos a 492 nm.

El valor de corte fue calculado como sigue: cov (*cut-off value*) = $m + 2.5 \delta$. Donde m es el promedio de los valores de absorbancia de los cueros negativos, y δ la desviación estándar (SD).

VIII. RESULTADOS

8.1. Obtención de aislados

Con el objetivo de obtener cepas de *T. cruzi* presentes en el Estado de Oaxaca, debidamente genotipificadas y caracterizadas biológica y antigénicamente, se realizó el aislamiento de cepas de parásito a partir de heces de triatominos con infección natural recolectados en las regiones del Istmo y Sierra Sur del Estado de Oaxaca. La identificación de los triatominos infectados se realizó mediante el análisis coproparasitológico de las heces, tomando como positivas aquellas muestras en donde se observó la presencia de epimastigotes o tripomastigotes metacíclicos (**Figura 9A**).

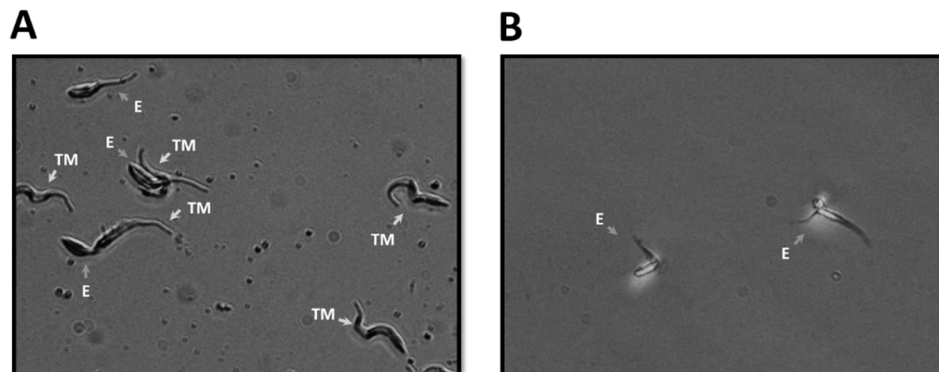


Figura 9. Identificación de formas de *T. cruzi* en heces de triatominos. A) Análisis coproparasitológico de heces de triatominos en donde se identificó la presencia de epimastigotes (E) y tripomastigotes metacíclicos (TM) de *T. cruzi*. **B)** Cultivos axénicos en medio LIT obtenidos de los parásitos aislados, cultivados con antibióticos y antimicóticos.

Para el proceso de axenización y aislamiento de los cultivos, primero se alimentaron los triatominos con sangre de ratón Balbc hasta saciarse para inducir su defecación y coleccionar las heces que contenían a los parásitos. Las muestras frescas se analizaron por microscopía óptica y las 8 muestras que resultaron positivas a la infección por *T. cruzi* fueron cultivadas en medio LIT suplementado con antibióticos y antimicóticos para su

axenización. Los cultivos fueron monitoreados cada 7 días para observar el crecimiento de formas del parásito y la disminución hasta su eliminación de bacterias u otros microorganismos como hongos, indicativo de la axenización de los cultivos (**Figura 9B**). De esta manera se obtuvieron ocho aislados los cuales fueron nombrados de acuerdo con una nomenclatura arbitraria que se estableció en el laboratorio previamente (Martínez-Cuevas, tesis de maestría 2013), que nos permite una identificación rápida y eficiente ya que resume la especie del triatomino y sus datos de recolección (**Tabla 4**).

Tabla 4. Aislados obtenidos, nomenclatura y características de su origen.

Nomenclatura	Abrev.	Región	Hospedero
TcOAX-IST-SC2-TphM	SC2	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-SC3-TphM	SC3	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-SC4-TphM	SC4	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-CI1-TphH	CI1	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-CI2-TphM	CI2	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-CI3-TphM	CI3	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-IST-CI4-TphM	CI4	Istmo	<i>Triatoma phyllosoma</i>
TcOAX-SSU-NM5-Tsp3	NM5	Sierra Sur	<i>Triatoma sp</i>

8.2. Genotipificación

T. cruzi tiene una gran diversidad genética que repercute en una variabilidad de sus propiedades biológicas y moleculares. Estas diferencias observadas en el parásito han propiciado el uso de distintos marcadores para la clasificación de sus cepas (Zingales, Miles et al. 2012), el estudio de su biología y el impacto que éstas tienen en la patología de la enfermedad de Chagas (Andrade 1974). Por lo tanto, la identificación de la DTU a la que pertenecen los aislados es necesaria para comprender la eco-epidemiología de la enfermedad de Chagas en México.

Como se mencionó anteriormente, los aislados del parásito obtenidos en el presente trabajo provenían de heces de triatominos infectados. La determinación de dicha infección se realiza mediante microscopía, lo que permite identificar la

presencia/ausencia de las formas de parásitos flagelados como es el caso de epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, pero también de otros flagelados. Tal es el caso de *Trypanosoma rangeli* que aun cuando se encuentra en las glándulas salivales del insecto transita temporalmente en el intestino del insecto. O de *Blastocrithidia triatomae* que está también presente en el aparato digestivo del triatmino. Por tanto, era fundamental determinar primero la especie de los cultivos de parásitos obtenidos, antes de iniciar con la genotipificación de los aislados y de su posterior caracterización biológica y antigénica.

Por tal motivo, tanto para determinar la especie como la DTU de los parásitos, se realizó la extracción de ADN genómico de cultivos axénicos de epimastigotes en fase logarítmica de cada uno de los aislados y de las cepas de referencia Y y CL Brener usadas como controles. La especie fue identificada mediante la amplificación de la secuencia C6 que es un elemento repetido en el genoma del parásito (Araya, Cano et al. 1997). Se obtuvo un producto de 330 pb (**Figura 10**), que indicaba que los aislados obtenidos en este trabajo efectivamente pertenecían a *T. cruzi* y que no se trataba de otro tripanosomátido.

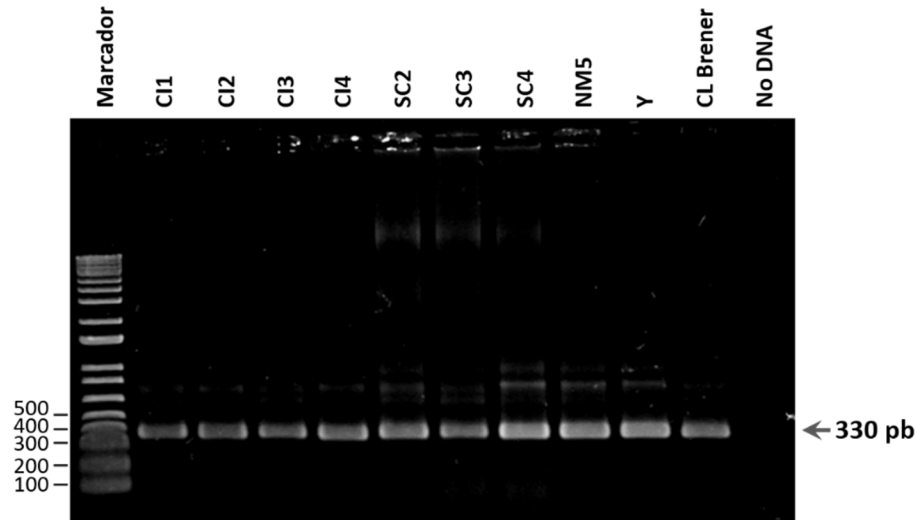


Figura 10. Determinación de la especie de los parásitos aislados, amplificando la secuencia repetida nuclear C6 de *T. cruzi*. Los productos de amplificación de la secuencia C6 se corrieron en un gel de agarosa 1%, obteniéndose un amplicón de 330 pb indicativo de que los 8 aislados obtenidos y cepas control Y y CL Brener pertenecen a cultivos de *T. cruzi*. Como se esperaba no se obtuvo amplificación en el control negativo en donde no se agregó ADN verificando la especificidad de la amplificación. Como marcador de tamaño se utilizó 1Kb plus de ADN ladder Invitrogen™.

Una vez que corroboramos que nuestros aislados eran cultivos de *T. cruzi*, empezamos con la identificación de su DTU, usando el método propuesto por (Brisse, Verhoef et al. 2001). Dicho método consiste en una serie de amplificaciones de tres secuencias distintas correspondientes a: la región intergénica del miniexón (IR-Miniexón), el dominio divergente D7 del gen 24 S α ARNr y finalmente de la región variable del gen 18S ARNr, que de acuerdo con el tamaño del producto amplificado podemos inferir el genotipo del parásito como se observa en la **Figura 11**.

De acuerdo con el diagrama descrito en la **Figura 11**, primero realizamos la amplificación del IR-miniexón que con un producto de amplificación de 350 pb discrimina a TcI del resto de las DTU, un amplicón de 300 pb para TcII, TcV y TcVI, o la ausencia de producto de amplificación para TcIII y TcIV. Si en esta primera amplificación no se puede determinar el genotipo del parásito, se realiza una segunda amplificación, pero ahora del dominio D7 del gen 24S α del ARNr que permite identificar a TcIII (amplicón de 110 pb), TcIV (amplicón de 125, 130 o 165 pb) y TcV (amplicones de 110 y 125 pb) de

TcII y TcVI (una banda de 125 pb). Finalmente se lleva a cabo la amplificación del gen 18S del ARNr para discriminar entre los DTUs II (con un producto de 165 pb) y VI (que no se obtiene producto).

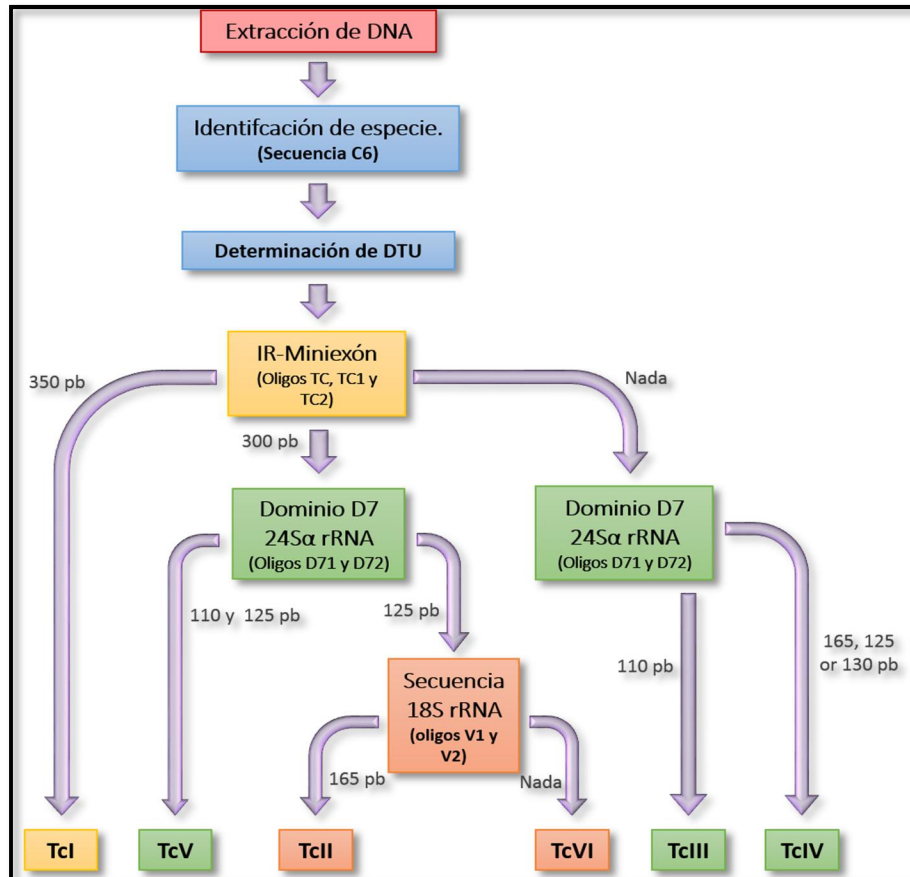


Figura 11. Método empleado para la genotipificación de *T. cruzi*. La Genotipificación del *T. cruzi* requiere de una serie de amplificaciones de 3 secuencias distintas, la región intergénica del miniexón (IR-Miniexón) utilizando los oligonucleótidos TC, TC1 y TCII, el dominio divergente D7 del gen 24 Sα rARNA usando los oligonucleótidos D71 y D72, y finalmente de la región variable del gen 18S ARNr con los oligonucleótidos V1 y V2, que de acuerdo con el tamaño del producto amplificado podemos inferir el genotipo del parásito. Método descrito por (Brisse, Verhoef et al. 2001)

Seguendo el protocolo descrito anteriormente, los resultados mostraron que la mayoría de los aislados corresponden a poblaciones TcI (CI1, CI2, CI3, CI4, SC2 y NM5), ya que se obtuvo un producto de amplificación de 350 pb con los oligonucleótidos para

el IR-miniexón (**Figura 12**). Sin embargo, en algunos casos también se observó un producto de 300 pb (CI3, CI4, SC2 y NM5), lo que indicaba que había poblaciones con dos marcadores moleculares distintos y por lo tanto la presencia de al menos dos poblaciones mezcladas con diferente DTU. En el caso particular de los aislados SC3 y SC4 se obtuvo únicamente un producto de 300 pb, lo mismo que en los controles Y y CL Brener, por tanto, se continuó con la amplificación del dominio D7 del gen 24S α del rARN para casi todos los parásitos excepto CI1 y CI2 en los cuales sólo se identificó a TcI.

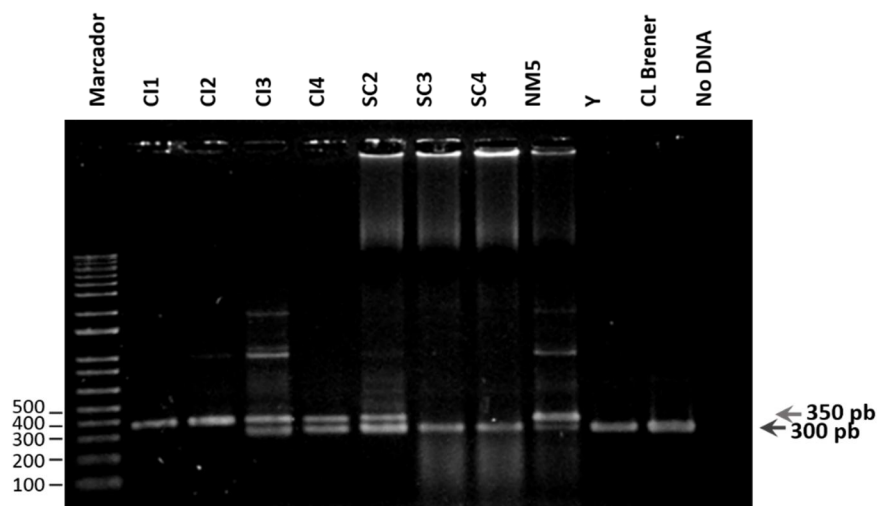


Figura 12. Identificación de TcI mediante la amplificación del IR-Miniexón de *T. cruzi*. Los productos de amplificación del IR-Miniexón se corrieron en un gel de agarosa 1.5%, un producto de 350 pb fue observado para los aislados con parásitos TcI (CI1, CI2, CI3, CI4, SC2 y NM5), mientras que un producto de 300 pb era indicativo de la posible existencia de parásitos TcII, TcV o TcVI. Como control negativo se corrió una muestra sin ADN (último carril). El gel se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio y como marcador de tamaño molecular se utilizó 1Kb plus de DNA ladder Invitrogen™ (primer carril).

Los resultados de la amplificación de D7 del gen 24S α del rARN indicaron que los aislados CI3, CI4, SC2, SC3 y SC4 presentaban dos productos de amplificación, una banda 110 pb y otra banda de 125 pb, característicos de TcV. En el caso de NM5, se observó sólo una banda de 125 pb, misma que se amplificó también en los controles Y y CL Brener (**Figura 13**).

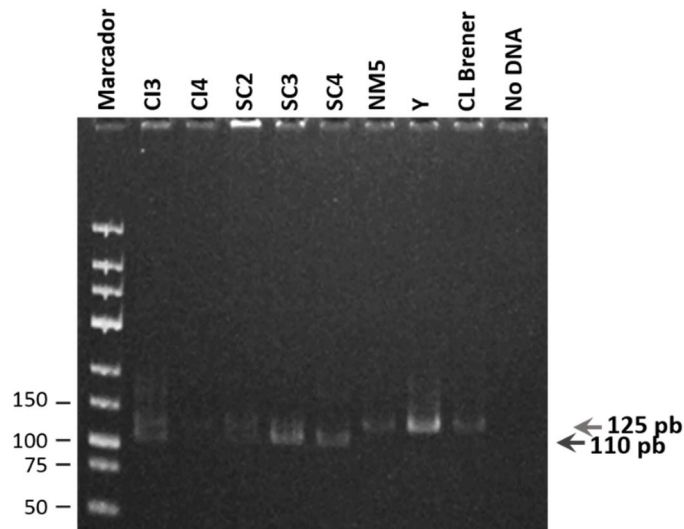


Figura 13. Identificación de TcV mediante la amplificación del dominio D7 del gen 24S α ARNr. Los productos de amplificación de D7 del gen 25S α rARN fue corrido en un gel de poliacrilamida al 5%. El doble producto obtenido de 110 y 125 identificó a TcV en CI3, CI4, SC3 y SC4, mientras que el producto de 125 pb indicaba que el aislado NM5 y las cepas de referencia pertenecen a TcII o TcVI. En el primer carril el marcador de tamaño molecular O'Gene Ruler Low Range DNA Ladder de 25 bp (Thermo Scientific), en el último carril se observa el control sin ADN.

Dado que aún faltaba identificar el segundo genotipo encontrado en el aislado NM5, y comprobar el genotipo de las cepas de referencia Y y CL Brener para validar los resultados obtenidos, se amplificó la región variable del gen 18S, en donde los productos de amplificación para el aislado NM5 y la cepa Y indicaban que los parásitos pertenecen a TcII. Mientras que, para la cepa CL Brener se observaron los resultados esperados indicando que se trataba de TcVI tal y como ha sido reportado previamente (**Figura 14**).

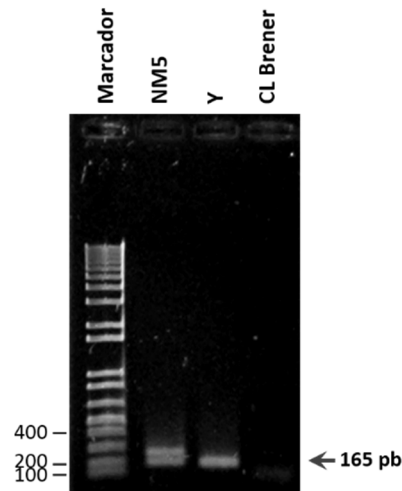


Figura 14. Identificación de TcII mediante la amplificación del dominio variable del gen 18S ARNr.

Los productos de amplificación del gen 18S ARNr de NM5 (165 pb) y de las cepas Y (165 pb) y CL Brener (sin amplificado) se corrieron en un gel de agarosa 1.5%. El producto de 165 pb obtenido indicó que los parásitos NM5 y Y son TcII, y donde no se observa producto de amplificación (CL Brener) indica que pertenece a TcVI. En el primer carril se muestra el marcador de tamaño molecular 1Kb plus de DNA leader Invitrogen™

Estos resultados nos indican que los aislados CI1 y CI2 son TcI, mientras que CI3, CI4, SC2, SC3 y SC4 muestran marcadores moleculares para TcI y TcV, encontrándose dos subpoblaciones con genotipo diferente presentes en esos cultivos. Y NM5 fue el único aislado que además de tener poblaciones TcI también presenta marcadores moleculares para TcII. En conjunto los resultados nos indican la presencia de poblaciones TcI, TcII y TcV de *T. cruzi* circulando en el Estado de Oaxaca. TcI había sido reportada previamente en ese Estado, además nuestro equipo de trabajo en un reporte previo identificó a TcV, sin embargo, es la primera vez que se encuentra a TcII en Oaxaca (Martínez Cuevas 2013).

8.3. Caracterización biológica

8.3.1. Curva de crecimiento

Con el objetivo de evaluar si los aislados de *T. cruzi* obtenidos se adaptaron eficientemente a las condiciones de cultivo *in vitro* y observar si tenían diferencias en sus tasas de crecimiento, se realizaron curvas de crecimiento con epimastigotes de cada uno de los aislados y de las cepas de referencia en medio LIT. La curva de crecimiento se inició con 1×10^6 epimastigotes/ml mantenidos en medio LIT complementado con 10% de SFB (ver materiales y métodos) evaluando el número de células viables cada 24 horas durante 7 días.

Como se muestra en la **Figura 15**, no se observaron diferencias a lo largo de toda la curva de crecimiento, ni entre los aislados ni con las cepas de referencia, indicando que se adaptaron correctamente a las condiciones de cultivo y en su mantenimiento *in vitro*. En todos los casos se observa una fase logarítmica similar, lo que indica que durante esta fase los parásitos inician su multiplicación exponencial de manera eficiente en el medio de cultivo. Posteriormente los cultivos llegan a la fase estacionaria al día 6, donde la multiplicación celular ha cesado y el número de células se mantiene constante, observándose que en todos los casos el crecimiento máximo de los cultivos se da a este tiempo. Estos resultados indican que efectivamente todos los aislados se adaptaron adecuadamente a las condiciones de crecimiento *in vitro* de laboratorio, permitiendo su mantenimiento y uso posterior para la realización de experimentos futuros.

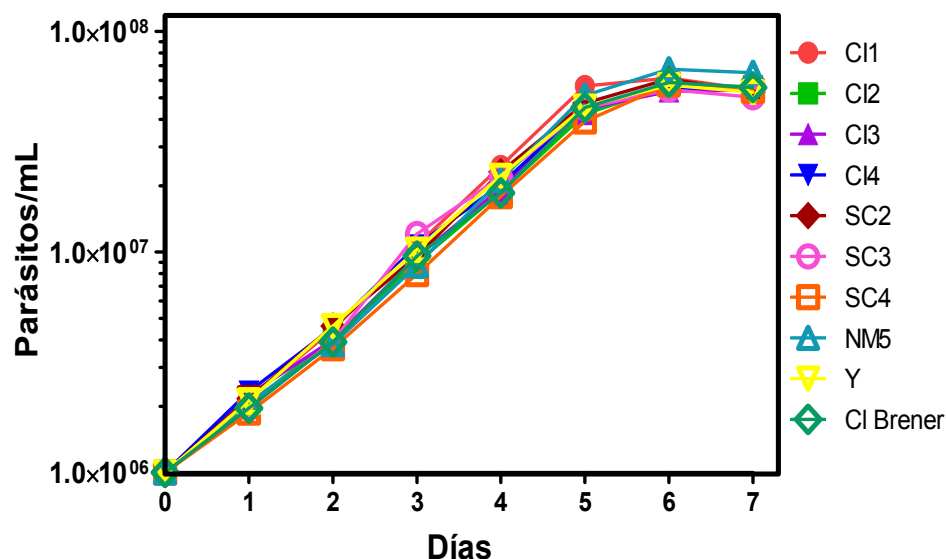


Figura 15. Curvas de crecimiento. Se realizó una curva de crecimiento con 1×10^6 epimastigotes en fase logarítmica, de cada uno de los aislados y de las cepas de referencia Y y CL Brener en medio LIT complementado con 10% SFB. La curva de crecimiento fue evaluada durante 7 días en los que se observó la cinética de crecimiento esperada (fase logarítmica y fase estacionaria). Se realizaron 3 experimentos independientes, en la curva se muestra la media y la desviación estándar.

8.3.2. Curvas de transformación

Las diferentes cepas de *T. cruzi* presentan heterogeneidad en la eficiencia de transformación de las formas no infectivas (epimastigotes) hacia sus formas infectivas (tripomastigotes metacíclicos, amastigotes y/o tripomastigotes) (Contreras, Salles et al. 1985, Cardoso, Soares et al. 2008). Por lo tanto, evaluamos la capacidad de diferenciación que presenta cada uno de los aislados obtenidos en dos condiciones distintas.

Una de las características que evaluamos fue la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en medio artificial de orina de triatomino (TAU3AAG), para evaluar la capacidad de metaciclogénesis. Para ello epimastigotes provenientes de cultivos axénicos en fase estacionaria tardía mantenidos en medio LIT se cultivaron en TAU3AAG y su transformación a tripomastigote metacíclico fue evaluada cada 24 horas mediante microscopía óptica, como se describe en materiales y métodos.

Observamos que todos los aislados y las cepas de referencia tienen diferentes capacidades de transformación, la cual inicia a las 24 horas y va incrementando conforme pasa el tiempo hasta alcanzar los máximos porcentajes de diferenciación al 5° día (aislados CI1, CI2, CI4, SC2, SC3 y SC4, y la cepa Y) o 6° día (aislados CI3 y NM5 y la cepa CL Brener) (**Figura 16A**). Como el día 6 fue el último día evaluado, se compararon los porcentajes de transformación de todos los aislados y las cepas de referencia, en este día de transformación (**Figura 16B**).

Los resultados mostraron que tanto los aislados como las cepas de referencia tienen un porcentaje de transformación diferente, siendo NM5 el aislado que exhibió la mayor eficiencia de transformación ($40.66 \pm 3.50\%$) y SC3 es el aislado con el nivel más bajo de metaciclogénesis ($0.68 \pm 0.60\%$). El mismo comportamiento diferencial se observó en las cepas de referencia, puesto que la cepa Y mostró una metaciclogénesis más alta ($37.87 \pm 2.77\%$) que la cepa CL Brener ($7.82 \pm 0.21\%$) (**Figura 16B**). Estos resultados indican que tanto los aislados y como las cepas de referencia tienen diferentes eficiencias de transformación, un comportamiento ya reportado previamente para otras cepas (Contreras, Salles et al. 1985).

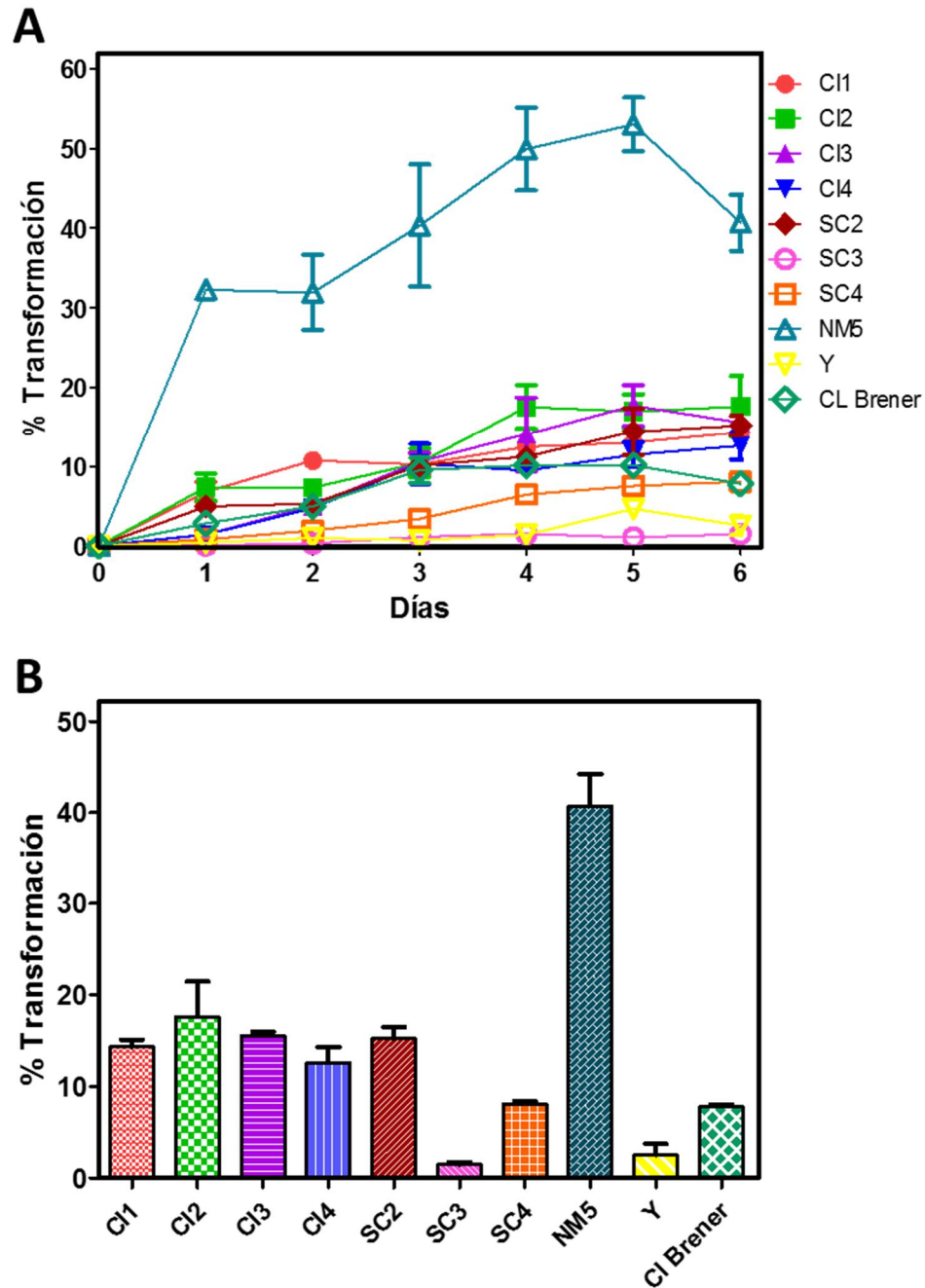


Figura 16. Evaluación de la eficiencia de metaciclogénesis de los aislados y cepas de referencia. A) Se realizó una curva de metaciclogénesis en medio TAU3AAG en donde se observó el comportamiento de diferenciación de los aislados y las cepas de referencia en medio durante 6 días. **B)** Comparación de la eficiencia de metaciclogénesis evaluado al sexto día de diferenciación. Se realizaron 3 experimentos independientes, en las figuras se muestra la media y la desviación estándar.

También evaluamos la capacidad de transformación de los parásitos a las formas presentes en el hospedero mamífero (amastigotes y tripomastigotes), en un sistema de transformación extracelular *in vitro*. Para ello se pusieron epimastigotes en fase logarítmica en contacto con fibroblastos 3T3 NIH en cultivo en medio DMEM complementado al 2% con SFB. Estos cultivos se mantuvieron durante 48 horas y se cuantificaron las formas de epimastigote, tripomastigote y amastigote presentes en el medio cada 24 horas.

Como se puede observar en la **Figura 17** los aislados muestran diferencias en su capacidad de transformación. En la diferenciación extracelular a las 24 horas los aislados CI1 (15.36 ± 1.79 %) y CI3 (17.25 ± 1.23 %), tuvieron los mayores porcentajes de diferenciación (**Figura 17A**), conservando sus altos niveles de transformación a las 48 horas (CI1 35.30 ± 3.02 % y CI3 33.61 ± 1.27 %), tiempo en que también el aislado SC3 (34.72 ± 0.93 %) y la cepa Y (44.53 ± 1.99 %), mostraron altos niveles de transformación (**Figura 17B**). Por el contrario, el aislado CI2 mostró tener el menor porcentajes de las formas infectivas del parásito (tripomastigotes y amastigotes), tanto a las 24 horas (1.84 ± 0.71 %), como a las 48 horas (11.77 ± 0.90 %), lo que posiblemente pudiera estar relacionado con su capacidad infectiva.

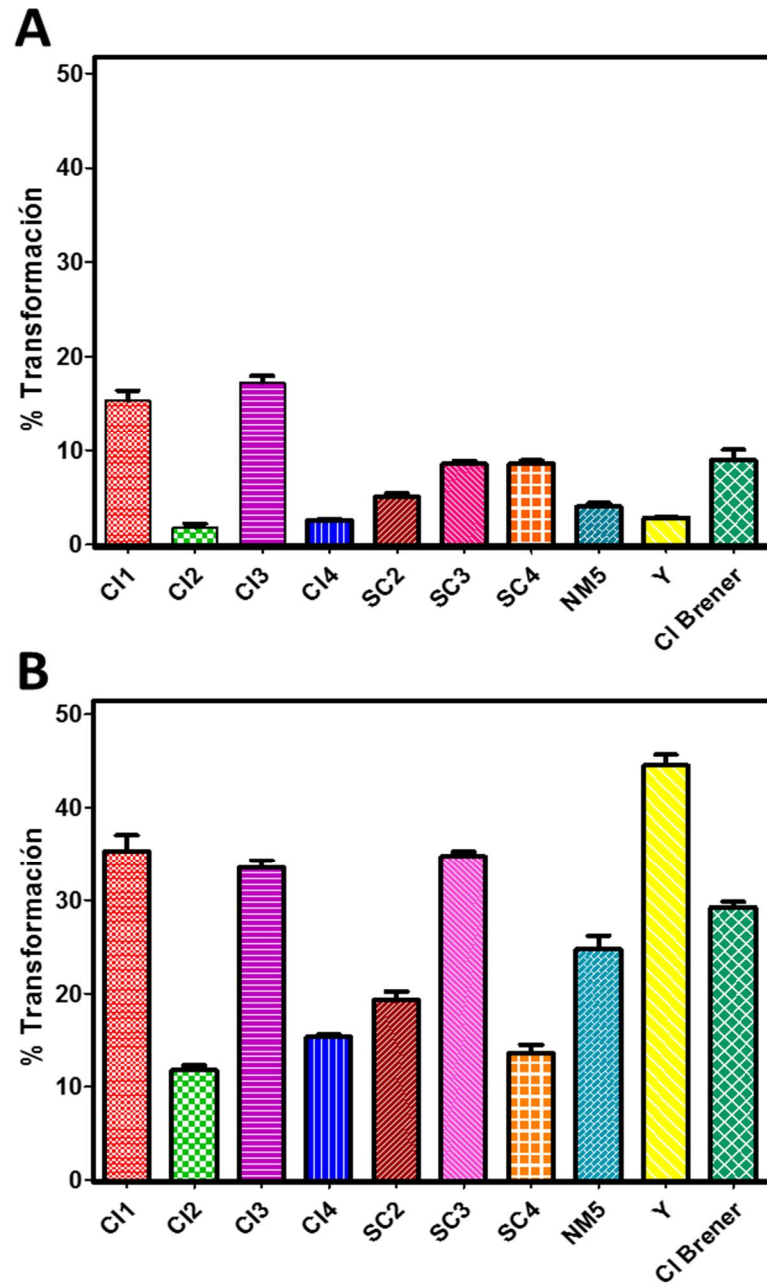


Figura 17. Transformación extracelular de epimastigotes en tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante de un cultivo celular de fibroblastos NIH 3T3. Los aislados muestran diferencias en su eficiencia de transformación de epimastigotes a tripomastigotes y amastigotes presentes en el sobrenadante de un cultivo celular de fibroblastos NIH 3T3 en medio DMEM complementado con 2% de SFB a las 24 (A) y 48 horas (B) de interacción. Se realizaron 3 experimentos independientes, en las figuras se muestra la media y la desviación estándar.

Estos resultados contrastan con lo observado en la metaciclologénesis en donde se observó que NM5 es el aislado con mayor transformación a tripomastigotes metacíclicos y poca diferenciación extracelular a tripomastigotes y amastigotes. Del mismo modo el aislado SC3 muestra una baja eficiencia de metaciclologénesis, pero uno de los más altos porcentajes de diferenciación extracelular. Este mismo comportamiento se observó en cepas de referencia control Y y CL Brener que tienen bajos niveles de metaciclologénesis y altos de diferenciación extracelular. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografía en donde se ha observado que las cepas de *T. cruzi* muestran diferencias en capacidad de transformación bajo diferentes condiciones no observándose correlación entre ellas. Estas variaciones podrían tener algún reflejo en el proceso de infectividad de los parásitos ya que algunos grupos sugieren la posibilidad de una mayor capacidad infectiva de cepas de parásitos que presentan un mayor porcentaje de diferenciación a las formas infectivas de *T. cruzi* (tripomastigotes) (Contreras, Salles et al. 1985).

8.3.3. Análisis morfométrico

Debido a que las cepas de *T. cruzi* muestran heterogeneidad en varias de sus características biológicas y moleculares, evaluamos sus propiedades morfométricas que es uno de los parámetros en que han mostrado variabilidad. Para ello se realizó un análisis de la longitud de cuerpo, longitud del flagelo, longitud total y ancho de parásitos teñidos con Giemsa y se calculó el promedio de las medidas de 25 parásitos evaluados, como se describe en materiales y métodos.

Aun cuando se observaron algunas diferencias morfométricas en cuanto al largo del cuerpo del parásito y/o flagelo, el promedio de las medidas indicó que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los aislados y las cepas de referencia (**Tabla 5**).

Tabla 5. Mediciones morfométricas de epimastigotes.

Cepa	Cuerpo (μm)	Flagelo (μm)	Longitud Total (μm)	Ancho (μm)
CI1	14.73 \pm 1.26	18.03 \pm 2.14	32.77 \pm 2.65	2.309 \pm 0.54
CI2	15.8 \pm 2.18	18.25 \pm 2.46	34.04 \pm 3.52	2.538 \pm 0.60
CI3	13.22 \pm 1.60	16.39 \pm 2.49	29.62 \pm 3.13	2.437 \pm 0.51
CI4	13.75 \pm 2.40	16.3 \pm 2.97	30.05 \pm 4.60	2.551 \pm 0.44
SC2	13.88 \pm 2.08	17.92 \pm 2.03	31.8 \pm 3.32	2.602 \pm 0.42
SC3	13.6 \pm 2.45	17.57 \pm 3.05	31.17 \pm 4.85	3.006 \pm 0.66
SC4	15.44 \pm 4.86	19.65 \pm 4.22	35.08 \pm 4.25	2.61 \pm 0.58
NM5	14.63 \pm 1.82	18.92 \pm 2.19	33.56 \pm 2.91	2.4 \pm 0.51
Y	13.41 \pm 2.76	17.84 \pm 2.50	31.25 \pm 3.70	3.091 \pm 0.47
CL Brener	14.42 \pm 1.55	17.57 \pm 2.15	31.99 \pm 2.88	3.027 \pm 0.67

Los valores representan la media y desviación estándar de 25 parásitos.

Además, en general el tamaño promedio de los epimastigotes de cada cepa está en el rango de tamaño reportado en la literatura en que se han reportado tamaños variables que oscilan entre 20-40 μm de longitud y un ancho de 2-3 μm (Rimoldi, Tome Alves et al. 2012).

8.3.4. Análisis *in vitro* de la capacidad infectiva de los parásitos aislados

T. cruzi tiene un amplio rango de hospederos mamíferos en los que se establece la infección con diferente eficiencia. Se ha propuesto que estas diferencias pueden deberse a las características biológicas, bioquímicas y moleculares propias de cada cepa de *T. cruzi*, así como a las características del hospedero por lo que se han establecido diferentes modelos de infección tanto *in vitro* como *in vivo* (Kress, Tanowitz et al. 1977, Andrade 1985, Camargos, Franco et al. 2000, Manning-Cela, Cortes et al. 2001, Espinoza, Rico et al. 2010, Florencio-Martinez, Marquez-Duenas et al. 2010).

Por lo tanto, dentro de la caracterización biológica de las cepas del parásito evaluamos su capacidad infectiva. Para ello llevamos a cabo ensayos *in vitro* realizando

infecciones de monocapas de fibroblastos HFF-1 con tripomastigotes derivados de infecciones. Las monocapas de fibroblastos fueron crecidas sobre cubreobjetos para poder realizar tinciones con DAPI y diferenciar las células con parásitos intracelulares y determinar el porcentaje de células infectadas en 5 campos observados al azar a las 18 horas post-infección. Se tomaron como células infectadas aquellas células donde se observaron parásitos intracelulares en sus formas de amastigote lo que aseguraba que las células estaban infectadas. Además, se realizó la medición de la infección a tiempos tempranos con la intención de cuantificar la capacidad infectiva inicial de los tripomastigotes que se pusieron a interaccionar directamente con los fibroblastos y no la acumulativa de los tripomastigotes que son liberados durante el progreso de la infección.

Los resultados mostraron que todos los aislados son infectivos, pero tienen eficiencias variables de infección, tanto entre ellos como con las cepas de referencia Y y CL Brener (**Figura 18**). El aislado SC4 tiene el nivel más alto de infección (8.67 ± 0.52), incluso por arriba de los niveles observados en las cepas de referencia Y (6.31 ± 0.60) y CL Brener (0.75 ± 0.09), que han sido reportadas como cepas altamente infectivas (Guedes, Veloso et al. 2007). Por el contrario, el aislado CI2 fue el que mostró menor porcentaje de células infectadas (0.75 ± 0.14) siendo al parecer el aislado menos infectivo, aunque a un nivel similar al observado en la cepa CL Brener que como se dijo antes es considerada infectiva (Guedes, Veloso et al. 2007).

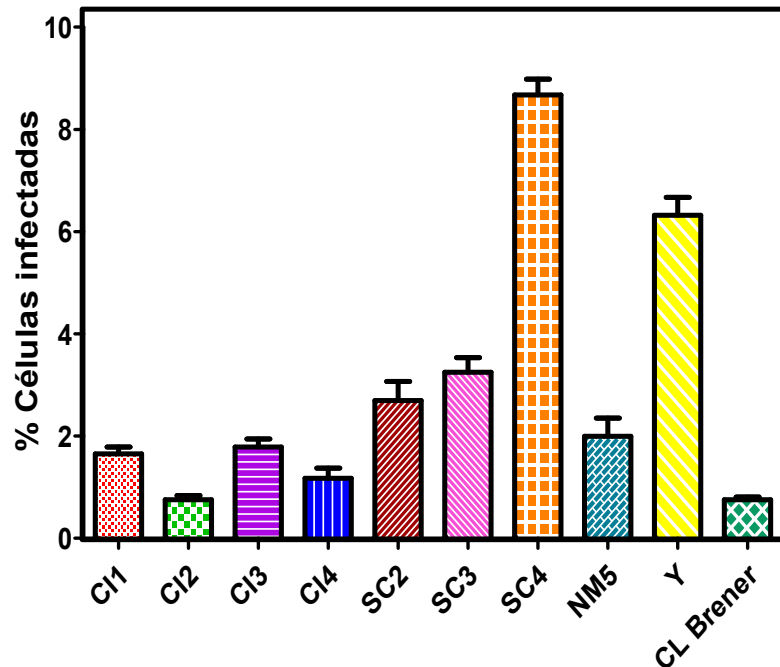


Figura 18. Infección *in vitro* de los aislados. Se evaluó la capacidad infectiva de los aislados tiempos tempranos inoculando cultivos celulares de células HFF-1 con Tripomastigotes provenientes de cultivos celulares de infecciones *in vitro*, todos los aislados y controles muestran la misma capacidad infectiva. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

8.3.5. Análisis *in vivo* de la capacidad infectiva de los parásitos aislados en un modelo murino

Si bien el estudio de la capacidad infectiva de las cepas de *T. cruzi* en modelos de líneas celulares es eficiente, siempre es necesario realizar también estudios en un modelo *in vivo* que asemeje lo que puede estar sucediendo durante la infección en el mamífero. Por ello en este trabajo nos propusimos también evaluar la capacidad infectiva de los parásitos aislados en un modelo murino.

Se inocularon 1×10^5 tripomastigotes metaciclícos vía intraperitoneal a grupos de 3 ratones Balb/c por cada aislado y cepa de referencia, y se monitoreó la cinética de parasitemia tres veces por semana para evaluar el período pre-patente (período en el que se establece la infección y no hay liberación de parásitos), los niveles de parasitemia en sangre (período patente) y periodo post-patente (cuando la infección declina), así como la sobrevivencia de los ratones.

La mayoría de los aislados mostraron una parasitemia como la esperada, con un periodo pre-patente, que en este caso se mantuvo en un rango del día 1 al día 10 post-infección, un periodo patente de la infección en forma creciente del día 5 al 13 y una fase post-patente en que se observa la caída de la parasitemia a partir del día 33 en la mayoría de los casos (**Figura 19A**).

El período pre-patente más corto fue de 5 días de la cepa NM5, es decir, éste fue el aislado que tardó menos tiempo en establecer su ciclo en el mamífero y presentó un inicio temprano en la parasitemia. En contraste el aislado CI2 no presentó la curva característica de una infección parasitaria, impidiendo observar los periodos pre-patente, patente y post-patente, ya que no pudimos detectar la presencia del parásito en sangre. Este resultado indicaba que esta cepa no es infectiva o que los niveles de infección que produce son tan bajos que fueron indetectables, posibilidad que se evaluó más tarde utilizando un inóculo un orden de magnitud mayor de parásitos (1×10^6) para iniciar la infección donde se sí se observó parasitemia (**Figura 19C**). Este resultado comprobó que el aislado CI2 también es infectivo, pero en menor proporción que los demás aislados necesiéndose un mayor inóculo al usado para el resto de los aislados para poder ver la parasitemia en ratón.

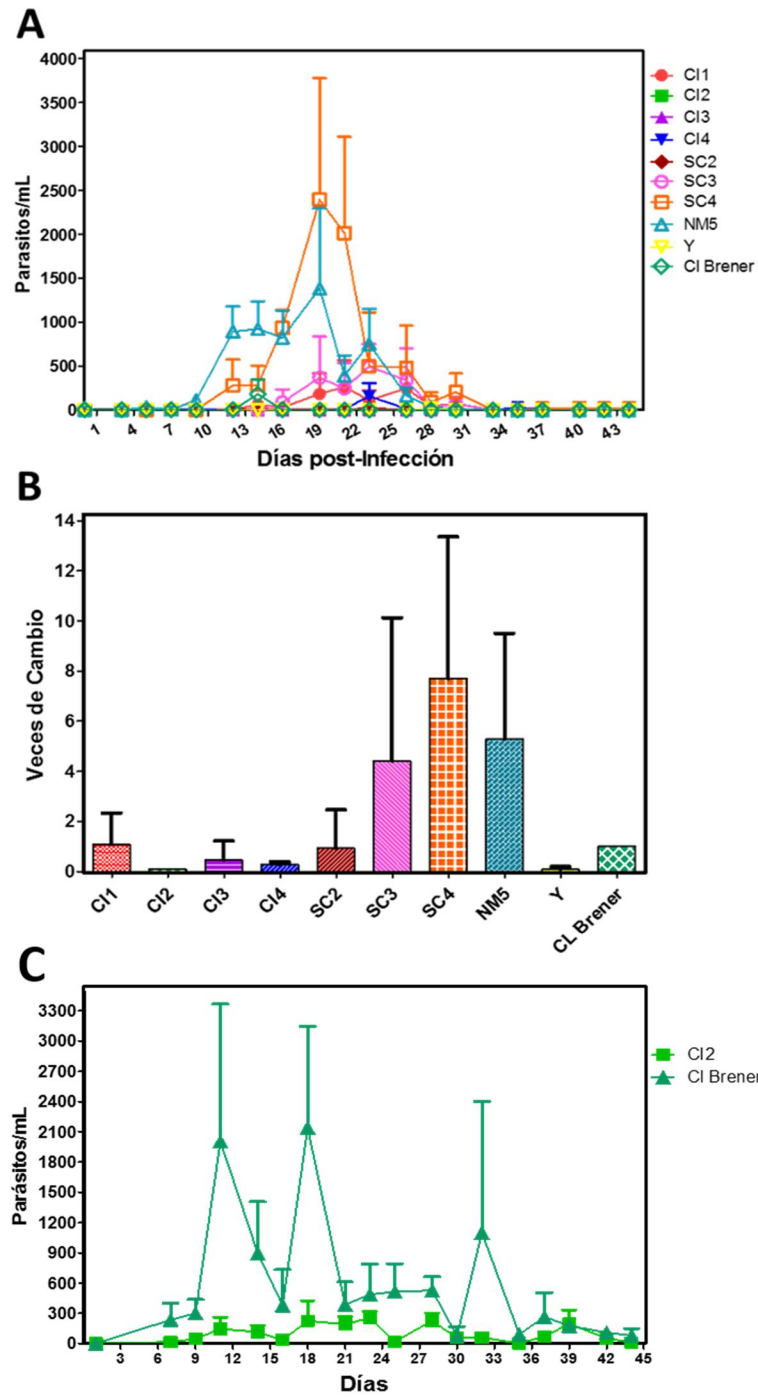


Figura 19. Curvas de parasitemia. **A)** Curva de parasitemia de ratones Balb/c, inoculados con 1×10^5 tripomastigotes metacíclicos de cada uno de los aislados y las cepas de referencia Y y CL Brener. Las parasitemias fueron evaluadas durante 45 días. **B)** Los picos de parasitemia de cada uno de los aislados fueron comparados con el grupo control CL Brener para evaluar su capacidad infectiva. **C)** Curva de parasitemia de ratones Balb/c, inoculados con 1×10^6 tripomastigotes metacíclicos del aislado CI2 y la cepa de referencia CL Brener, para evaluar la infectividad de CI2. Las parasitemias fueron evaluadas durante 45 días. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los aislados que presentaron mayores niveles promedio de parasitemia y, por tanto, los parásitos más infectivos de los aislados y cepas de referencia fueron SC4 (2395 parásitos/ml) y NM5 (1385 parásitos/ml) como podemos observar en la **Figura 19A**. Para valorar mejor los niveles de infección *in vivo*, se normalizaron los datos obtenidos en el pico máximo de la parasitemia de cada uno de los aislados y la cepa Y con respecto al control CL Brener (**Figura 19B**). Estos resultados muestran más claramente que los aislados SC4 y NM5 fueron las cepas con mayor infectividad, en una proporción 7 y 5 veces mayor a la cepa de referencia CL Brener. El resto de los aislados mostraron niveles variables de infectividad. Es importante resaltar que en el caso particular de SC4, observamos que conservó su alta infectividad tanto en los ensayos *in vitro* (**Figura 18**) como en los ensayos *in vivo* (**Figura 19**).

También se evaluó la sobrevivencia de los ratones infectados a los 150 días post-infección (**Tabla 6**), obteniendo un 100% de sobrevivencia en los grupos de ratones infectados tanto con los aislados como con las cepas Y y CL Brener. Cabe mencionar que los tripomastigotes metacíclicos con los que se iniciaron las infecciones son obtenidos *in vitro* a partir de epimastigotes mantenidos en cultivo como se describe en materiales y métodos. Posiblemente si se hacen infecciones consecutivas con tripomastigotes sanguíneos obtenidos de infecciones mantenidas en ratón la infectividad de los parásitos se verá exacerbada y se observaría mortalidad en los ratones como ya se ha reportado en la literatura.

Tabla 6. Máximos niveles de parasitemia, día máximo de parasitemia y sobrevivencia de ratones Balb/c.

Aislado/ Cepa	Máxima Parasitemia	Día Máximo de Parasitemia	Infectividad	Mortalidad
	(Tripomastigote/ml)		(%)	(%)
CI1	265	21	100	0
CI2	0	No determinado	No determinado	0
CI3	8	30	100	0
CI4	158	23	100	0
SC2	25	23	100	0
SC3	495	23	100	0
SC4	2395	19	100	0
NM5	1385	19	100	0
Y	15	28	100	0
CL Brener	183	14	100	0

Estos resultados en conjunto muestran que los diferentes aislados presentan diferente capacidad infectiva al igual que lo reportado en la literatura para otros aislados y cepas del parásito (Deneris and Marshall 1989, Carneiro, Romanha et al. 1991, Andrade and Magalhães 1997, Devera, Fernandes et al. 2003, Espinoza, Rico et al. 2010, Andrade, Campos et al. 2011, Risso, Sartor et al. 2011, Rimoldi, Tome Alves et al. 2012).

8.4. Identificación de antígenos

Una vez genotipificadas las cepas aisladas y determinadas sus características biológicas, se procedió a determinar sus características antigénicas. Para ello era necesario contar con cepas de parásitos circulantes en un estado endémico a la enfermedad de Chagas en México, así como la obtención de sueros humanos con anticuerpos anti *T. cruzi* provenientes del mismo estado que proporcionaran una mejor reactividad, para la identificación de antígenos autóctonos. Por lo tanto, como cepas utilizamos las cepas aisladas y caracterizadas en este trabajo de investigación junto con las obtenidas en mi trabajo previo de maestría, las cuales se resumen en la **Tabla 7** y como sueros los que se describen a continuación.

Tabla 7. Aislado de *T. cruzi* utilizados para la identificación de antígenos.

CEPA	METACICLOGÉNESIS (%)	DIFERENCIACIÓN EXTRACELULAR (%)	INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> (%) 18H	INFECCIÓN <i>IN VIVO</i>		DTU
				Max. Parasitemia (parasites/mL)	No. veces (CL Brener)	
TE1	29.89	9.214	2.16	108	0.44	Tcl
CI1	14.35	15.362	1.65	265	1.09	Tcl
CI2	17.61	1.84	0.75	0	0	Tcl
CI3	15.21	17.248	1.78	8	0.03	Tcl y TcV
CI4	12.62	2.556	1.17	158	0.65	Tcl y Tcv
SC1	61.03	38.817	2.63	366	1.51	Tcl y TcV
SC2	15.21	5.083	2.69	23	0.09	Tcl y TcV
SC3	1.48	8.575	3.25	495	2.05	TcV
SC4	8.1	8.59	8.67	2395	9.93	TcV
NM1	3.96	17.777	6.14	2633	10.92	Tcl
NM2	36.7	5.808	5.97	1275	1.62	Tcl
NM3	20.21	20.555	3.11	2325	9.62	Tcl
NM4	12.99	7.326	19.16	158	0.65	Tcl
NM5	40.66	4.055	1.99	1385	5.74	Tcl y TcII
SS3	23.43	4.752	7.42	50	0.13	Tcl

8.4.1. Caracterización de los sueros humanos reactivos a *T. cruzi*

Se obtuvieron un total de 112 sueros provenientes del Estado de Oaxaca, donados por dos instituciones distintas: el Centro de transfusión estatal (CETS) y el laboratorio 13 de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la UABJO, que se encuentra bajo la dirección del Dr. Luis Alberto Osorio Hernández (**Apéndice 1**). Se obtuvo un total de 59 sueros reactivos a *T. cruzi*, 9 unidades de sangre y 14 muestras serológicas por parte del CETS, y 36 muestras provenientes de la localidad El Potrero del Municipio de Santa María Huazolotitlán localizado en la región de la costa del Estado de Oaxaca, que fueron obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Luis Alberto Osorio Hernández. Así mismo, se obtuvieron un total de 54 sueros no reactivos al parásito, 4 unidades de sangre que dieron reactivas a otros microorganismos (datos no proporcionados) diferentes a *T. cruzi* por parte del CETS, y 40 sueros no reactivos a *T. cruzi* provenientes de la localidad El Potrero. Además, obtuvimos 1 suero proveniente de una zona no endémica con infección a *Plasmodium falciparum*, así como 10 sueros no reactivos a *T. cruzi* provenientes de zona endémica.

En un análisis muy general de las muestras obtenidas, observamos que se obtuvieron cantidades similares por género entre grupos, es decir, 33 sueros reactivos y 30 no reactivos del género femenino; 23 sueros reactivos y 22 sueros no reactivos del género masculino, así como 3 sueros con los cuales no contamos con los datos completos (**Tabla 8**). Las edades de los donantes de las muestras fueron muy variadas, pues oscilan entre los 3 a los 73 años en el caso de los sueros reactivos, y de 6 a 64 años en el caso de los sueros no reactivos.

Tabla 8. Datos generales de los pacientes.

Reactividad	Núm. de Individuos	Sexo			Edad (años)		
		Femenino	Masculino	Sin Datos	Menor	Mayor	Media
Positiva	59	33	23	3	3	73	41.41
Negativa	53	30	22	3	6	64	30.41

Para los ensayos de identificación de antígenos de las cepas aisladas era importante confirmar la reactividad de las muestras sanguíneas/serológicas, confirmando la presencia de anticuerpos IgG dirigidos contra *T. cruzi*. Con este fin, se confirmó la reactividad o no reactividad de una muestra representativa de 35 sueros (21 positivos y 14 negativos), calculando el tamaño de esta muestra representativa con la fórmula para estimar la proporción de una población finita (García García, Jiménez Ponce et al. 2011). Siguiendo las recomendaciones de la OMS, se realizaron al menos 3 pruebas diagnósticas diferentes, de las cuales un mínimo de 2 necesita ser positivas para considerar la muestra sanguínea analizada como reactiva a *T. cruzi*. En un primer grupo se utilizaron 3 pruebas que comúnmente se utilizan en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), consistentes en: Elisa comercial (Test Elisa para Chagas III/Grupo BIOS, Santiago, Chile), Elisa Casero e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), en donde para los dos últimos, utilizamos extractos totales de proteínas (ELISA) y parásitos fijados (IFI) de la forma de epimastigotes de 21 cepas provenientes de distintos Estados de la República aislados por el InDRE. Además, utilizamos algunos ensayos implementados en el laboratorio tales como ELISA a partir de extractos totales de epimastigote y tripomastigotes derivados de cultivo celular y *WB* (**Tabla 9**). En la siguiente

tabla se muestran los resultados de 35 sueros (etiquetados de origen como 21 reactivos y 14 no reactivos) en los cuales se aplicó el esquema completo de 7 pruebas distintas (3 aplicadas comúnmente en el InDRE y 4 implementadas en nuestro laboratorio).

Tabla 9. Información general de la caracterización de los sueros.

MUESTRAS		CHAGAS TEST III	ELISA CASERO INDRE	IFI INDRE	WESTERN BLOT Extracto total Epim.	ELISA CASERO QRO. (1:200)	ELISA CASERO Y. (1:200)	ELISA TRIPOMASTIGOTES
Reactivas	R1	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
	R2	Neg	Neg	Pos	Pos	Ind	Ind	Ind
	R3	Pos	Ind	Pos	Ind	Ind	Ind	Ind
	R4	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
	R5	Neg	Neg	Neg	Neg	Ind	Ind	Neg
	R6	Pos	Nd	Nd	Pos	Pos	Pos	Pos
	R7	Pos	Nd	Nd	Pos	Pos	Pos	Pos
	R8	Pos	Nd	Nd	Pos	Neg	Neg	Pos
	R9	Pos	Nd	Nd	Pos	Pos	Ind	Pos
	R10	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R11	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R12	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	R13	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R14	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R15	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R16	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R17	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	R18	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	R19	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R20	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
	R21	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Pos
No Reactivas	NR1	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
	NR2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Ind	Neg
	NR3	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
	NR4	Neg	Neg	Pos	Pos	Ind	Neg	Neg
	NR5	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg
	NR6	Neg	Pos	Nd	Nd	Nd	Nd	Neg
	NR7	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Neg
	NR8	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	NR9	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Neg
	NR10	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	NR11	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Neg
	NR12	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
	NR13	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Neg
	NR14	Neg	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Ind
CutOff =		0.452	0.315	01:32	1:500/1:2000	0.071	0.086	0.085

Pos= Positivo; Neg= Negativo; Ind= indeterminado; Nd= No determinado.

Los resultados obtenidos durante la caracterización de los sueros mostraron que existen discrepancias entre las pruebas utilizadas, ya que no todas las muestras presentan reactividad en todos y cada uno de los ensayos evaluados, a excepción de R1 y R4 que dieron reactividad positiva a todas las pruebas. Del mismo modo los sueros clasificados de origen como no reactivos en algunas pruebas dieron positivos o se encontraban en zona gris. Incluso en el caso de NR5, que es un suero que proviene de zona no endémica y tenemos certeza de que el individuo no se encontraba infectado con *T. cruzi*, dos de las pruebas aplicadas dieron positivas. Por tanto, decidimos también incluir la identificación de ADN del parásito en las muestras mediante la amplificación de dos secuencias especie-específicas de *T. cruzi*, la secuencia repetitiva C6 y la IR-Miniexón de *T. cruzi* (**Tabla 10**). Para ello se realizó la extracción de ADN de 200 μ L de suero/sangre y procesó inmediatamente para realizar la amplificación de las secuencias antes mencionadas, como se describe en materiales y métodos.

Tabla 10. Amplificación de secuencias especie-específicas de *T. cruzi*.

MUESTRAS	SECUENCIA C6	IR-MINIEXON	
Reactivas	R1	Pos	Pos
	R2	Neg	Pos
	R3	Neg	Pos
	R4	Neg	Neg
	R5	Neg	Neg
	R6	Pos	Pos
	R7	Pos	Neg
	R8	Pos	Neg
	R9	Pos	Neg
	R10	Pos	Pos
	R11	Pos	Pos
	R12	Pos	Pos
	R13	Pos	Pos
	R14	Pos	Pos
	R15	Pos	Neg
	R16	Pos	Pos
	R17	Pos	Neg
	R18	Pos	Neg
	R19	Pos	Neg
	R20	Pos	Neg
	R21	Pos	Pos
	R22	Pos	Pos
No Reactivas	NR1	Pos	Pos
	NR2	Pos	Pos
	NR3	Pos	Pos
	NR4	Pos	Neg
	NR5	Neg	Neg
	NR6	Neg	Neg
	NR7	Neg	Neg
	NR8	Neg	Neg
	NR9	Neg	Neg
	NR10	Neg	Neg
	NR11	Neg	Neg
	NR12	Neg	Neg
	NR13	Neg	Neg
	NR14	Neg	Neg

Pos= Postivo, sí hubo amplificación; Neg= Negativo, no hubo amplificación.

Se tomaron como positivas aquellas muestras en donde se observó, mediante geles de agarosa, el producto de amplificación del tamaño esperado, de 330 pb para C6 y de 300/350 para el IR-Miniexón. Los resultados mostraron que en 19 de los 21 (90.47 %) sueros originalmente clasificados como reactivos, son positivos a *T. cruzi* y 10 de los 14 (71.43 %) sueros originalmente clasificados como no reactivos, fueron negativos al parásito. Lo que indicaba cuales, de los sueros reactivos, y los sueros no reactivos eran adecuados para continuar con los experimentos. En el caso de la muestra NR5 efectivamente dio negativa a la presencia de *T. cruzi*. Estos resultados indicaron que la prueba de PCR ayudó como una prueba adicional adecuada para la clasificación de las muestras como reactivas o no reactivas.

De los resultados anteriores se seleccionaron los sueros R1, R4, R6 y R7 como reactivos para llevar a cabo los estudios de WB, por dar positivos a las 7 pruebas serológicas, a WB y a PCR. También de los sueros no reactivos se seleccionaron NR5, NR6, NR7, NR8 y NR9, por dar negativos a las dos pruebas serológicas que se les aplicaron y a PCR (**Tabla 9 y 10**). Para los ensayos de inmunoprecipitación, se usó una mezcla de 59 sueros clasificados de origen como reactivos, debido a que en nuestra caracterización todos ellos dieron positivos a las pruebas de WB y ELISA usando extractos totales de tripomastigotes de la cepa Querétaro, que mostraron ser de utilidad en nuestros experimentos confirmatorios de reactividad positiva. Y como negativos se usaron NR5 (suero de zona no endémica), NR6 y NR41 por dar negativos a 6 pruebas (ELISA comercial, ELISA con extractos totales de epimastigotes de las cepas Querétaro y Y, ELISA con extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro, WB con extracto total de epimastigotes, y PCR de las dos secuencias analizadas) en los dos primeros casos y a 3 pruebas (ELISA comercial, WB y ELISA con extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro) en el tercer caso. Cabe mencionar que no se aplicó todo el panel completo de pruebas a todos los sueros, por razones económicas y de tiempos diferentes de recepción de éstas, pero sí se aplicaron a todas las muestras aquellas pruebas que mostraron los resultados más confiables.

8.4.2. Análisis de WB

Con el fin de saber si también existe variabilidad antigénica entre cepas de *T. cruzi* e identificar antígenos del parásito que pudieran ser reconocidos por los distintos sueros mostrando estar compartidos entre diferentes cepas del parásito (**Tabla 7**), se realizaron ensayos de WB con extractos totales de proteínas de tripomastigotes derivados de infecciones en cultivo celular de las cepas NM1-cl1, Querétaro, NM1 y NM2, así como de la cepa de referencia CI-Brener. Cabe señalar que se utilizaron tripomastigotes debido a que es la forma de desarrollo presente en el mamífero y que solo se analizó una parte de cepas del parásito para mayor facilidad del estudio.

Se corrieron 400 µg de proteínas de extractos totales de tripomastigotes, en geles preparativos de poliacrilamida de diferentes aislados (NM1 y NM2), clonas (NM1-cl1) o cepas de referencia, (Querétaro y CL Brener). Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, donde después fueron expuestas a los sueros reactivos al parásito (**Figura 20A**), o a sueros no reactivos (**Figura 20B**), con la finalidad de que existiera reconocimientos de los anticuerpos IgG de humano a las proteínas del parásito. Como se puede observar en la **Figura 20**, se obtuvo un patrón de reconocimiento variable entre los distintos sueros analizados.

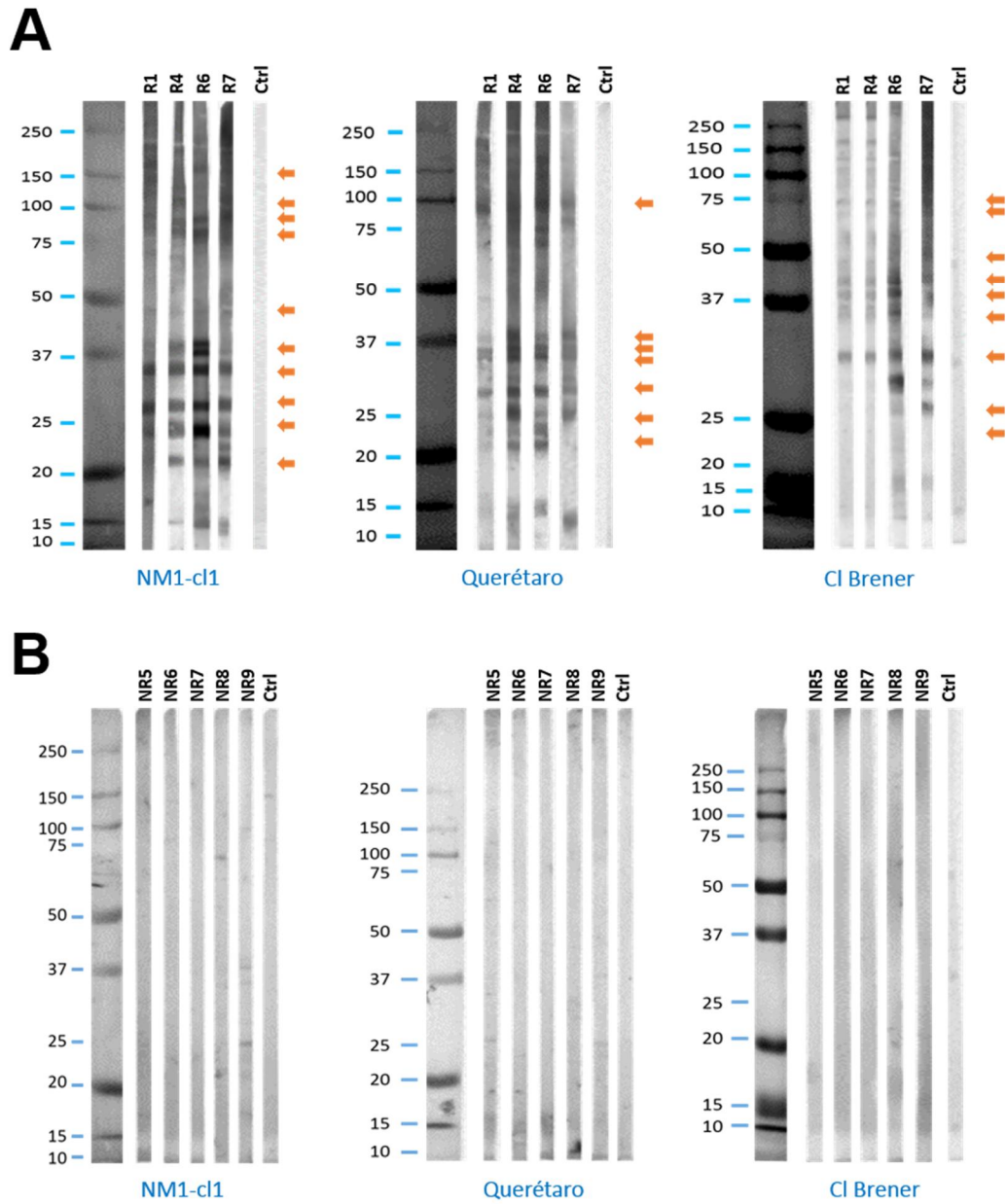


Figura 20. Western blot de extractos totales de tripomastigotes. **A)** *Western blot* realizado extractos totales de tripomastigotes y sueros reactivos. **B)** *Western blot* realizado con extractos totales de tripomastigotes y sueros no reactivos. Las flechas indican las bandas con mayor reconocimiento por los sueros reactivos.

De acuerdo con el número de bandas que se observaron en el ensayo de *WB* pudimos clasificar los sueros en tres grupos: sueros altamente reactivos, sueros con reactividad intermedia y sueros con baja reactividad. En el caso de los sueros menos

reactivos se identificaron alrededor de 4 bandas en un rango de peso molecular de 19 a 240 KDa. En el caso de los sueros con mediana reactividad, se identificaron alrededor de 12 bandas en un rango de peso molecular de 10 a 260 KDa. Finalmente, con los sueros con alta reactividad, se identificaron alrededor de 28 bandas con un rango de peso molecular de 10 a 271 KDa. No se observó reconocimiento con los sueros negativos, como era esperado. En los sueros con alta y mediana reactividad se identificó una banda de peso molecular aproximado de 36 KDa, que se detectó de manera constante utilizando extractos totales de proteínas de las cepas mexicanas NM1-cl1, Querétaro, NM1 y NM2, así como en la cepa CL Brener. En el caso de los sueros con baja reactividad no se observó reconocimiento constante de alguna banda en particular.

La banda de 36 KDa identificada con los sueros alta y medianamente reactivos, se cortó del gel de poliacrilamida y se analizó por espectrometría de masa, donde fue analizada mediante la técnica MS-ESI. Los resultados mostraron un total de 446 proteínas del parásito presentes en dicha banda (36 KDa). De éstas, 318 estaban presentes en los tres experimentos independientes, mientras que 128 se encontraban solamente en dos de ellos, mostrando la alta reproducibilidad de los resultados. Estas proteínas fueron posteriormente cotejadas con las proteínas identificadas en los ensayos de Inmunoprecipitación para identificar aquellas proteínas probables de reconocimiento antigénico, cuyo análisis se describe más adelante.

Estos resultados en conjunto mostraron una variabilidad antigénica entre distintas cepas del parásito al igual que la observada en sus características biológicas y genéticas. Además, el hecho de que los sueros reactivos dieron señal en los ensayos de WB y no así los sueros no reactivos, confirma que nuestros criterios de selección de sueros reactivos *versus* no reactivos son adecuados.

8.4.3. Inmunoprecipitación y detección de antígenos de epimastigotes

Ya que observamos variabilidad antigénica entre cepas del parásito, quisimos evaluar e identificar a los antígenos propios de las cepas de *T. cruzi* aisladas en este trabajo de investigación y el previo, obtenidas del estado de Oaxaca (Martínez Cuevas

2013), utilizando para ello sueros de individuos infectados provenientes del mismo estado. Como se dijo anteriormente, nuestro lugar de estudio es el Estado de Oaxaca, por ser uno de los estados de México más endémicos para la enfermedad de Chagas.

Debido a la gran cantidad de aislados (15) y sueros (59) con los que contábamos para este estudio, decidimos utilizar como estrategia ensayos de inmunoprecipitación que permiten utilizar mezclas tanto de los extractos totales de los parásitos de los aislados, así como la mezcla de diferentes sueros. En un primer acercamiento, y con la intención de verificar si se encontraban proteínas antigénicas compartidas por estadio, realizamos primero un ensayo de inmunoprecipitación con extractos totales de epimastigotes (esta sección) y posteriormente con tripomastigotes (sección 8.4.4). Por lo tanto, primero utilizamos una mezcla de proteínas totales de epimastigotes, en cantidades 1:1 de cada uno de los 15 aislados (obtenidos en este trabajo y el previo de maestría). Estos extractos se pusieron a interaccionar con una mezcla de los 59 sueros reactivos o con la mezcla de 3 sueros no reactivos como control.

Se identificó un perfil proteico entre los sueros positivos y los sueros negativos en un rango de peso molecular de 10 a 160 KDa (**Figura 21**). Los resultados de los controles negativos (sueros no reactivos), permitieron descartar aquellas bandas sugerentes de ser resultado de reacción cruzada, resultando en un perfil de reconocimiento antigénico con los sueros positivos de 16 bandas (12, 17, 20, 25, 30, 33, 41, 45, 50, 57, 63, 67, 70, 88, 97 y 100 KDa) con un peso molecular en un rango de 12 a 100 KDa.

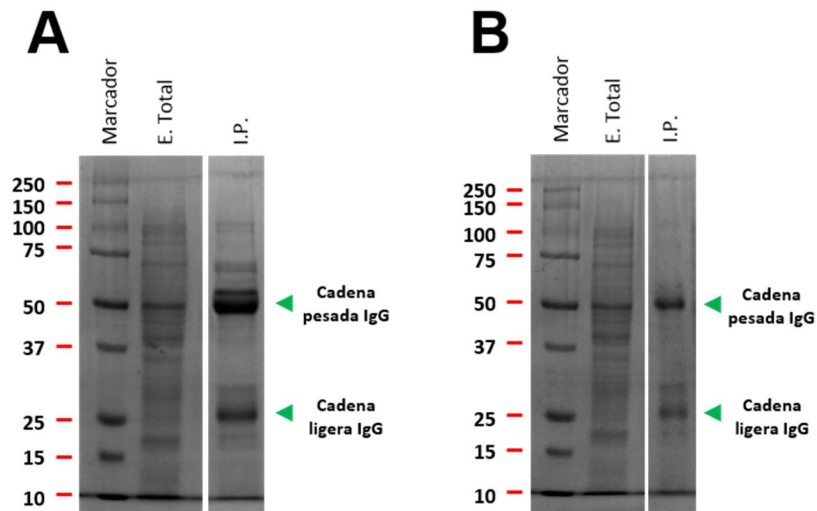


Figura 21. Perfil de Inmunoprecipitación de epimastigotes. A) Perfil de reconocimiento antigénico (I.P.) a extractos totales (E. Totales) de epimastigotes con los sueros reactivos a *T. cruzi*. **B)** Perfil de reconocimiento antigénico (I.P.) a extractos totales de epimastigotes (E. Totales) de los sueros no reactivos a *T. cruzi*. Las flechas verdes indican la cadena pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos IgG de humano.

Mediante un análisis de espectrometría de masas acoplado a Maldi-TOF/TOF, se identificaron inicialmente 68 proteínas totales distintas con los sueros reactivos y 20 con los sueros no reactivos. Considerando únicamente aquellas secuencias que tenían más del 95% de cobertura y al menos 4 péptidos identificados por secuencia fueron seleccionadas 66 proteínas totales, de las cuales 64 fueron identificadas con los sueros reactivos y 9 con los sueros no reactivos. De éstas últimas, se eliminaron aquellas que estaban compartidas en ambos grupos quedando un total de 60 proteínas distintas (90.90%) reconocidas sólo por los sueros reactivos. De las proteínas encontradas al 50% (30) se les identificó una función, al 31.67% (19) fueron reconocidas con una función putativa y al 11.33% (11) restante no se les pudo asociar con alguna función, quedando como proteínas hipotéticas. Dentro de las proteínas que se les reconoció alguna localización o función se encuentran 4 proteínas de superficie (6.67%), 6 citoplasmáticas (10.00%), 18 ribosomales (30.00%), 2 transalidasas (3.33%) y los 19 restantes correspondieron a retrotrasposones (31.67%). La localización celular que se les encontró a las proteínas fue la siguiente: citoplásmica (51.47%), Mitocondrial (19.12%), Nuclear (13.24%), Retículo Endoplásmico (10.29%), Membrana plasmática (2.94%),

Citoesqueleto (1.47%), Extracelular (1.47%). Se les reconoció alguna función celular a estas proteínas dentro de las que se encontraron 11 proteínas hipotéticas (18.33%), es decir, sin función conocida, 18 proteínas ribosomales (30%), 4 proteínas enzimáticas (6.67%), 3 MASP (5.00%), 2 proteínas que forman parte del citoesqueleto (3.33%), 2 transialidasas (33.33%), 1 proteína glicosomal (1.67%) y en su mayoría encontramos secuencias que pertenecen a retrotransposones (19/ 31.67%) (**Figura 22**).

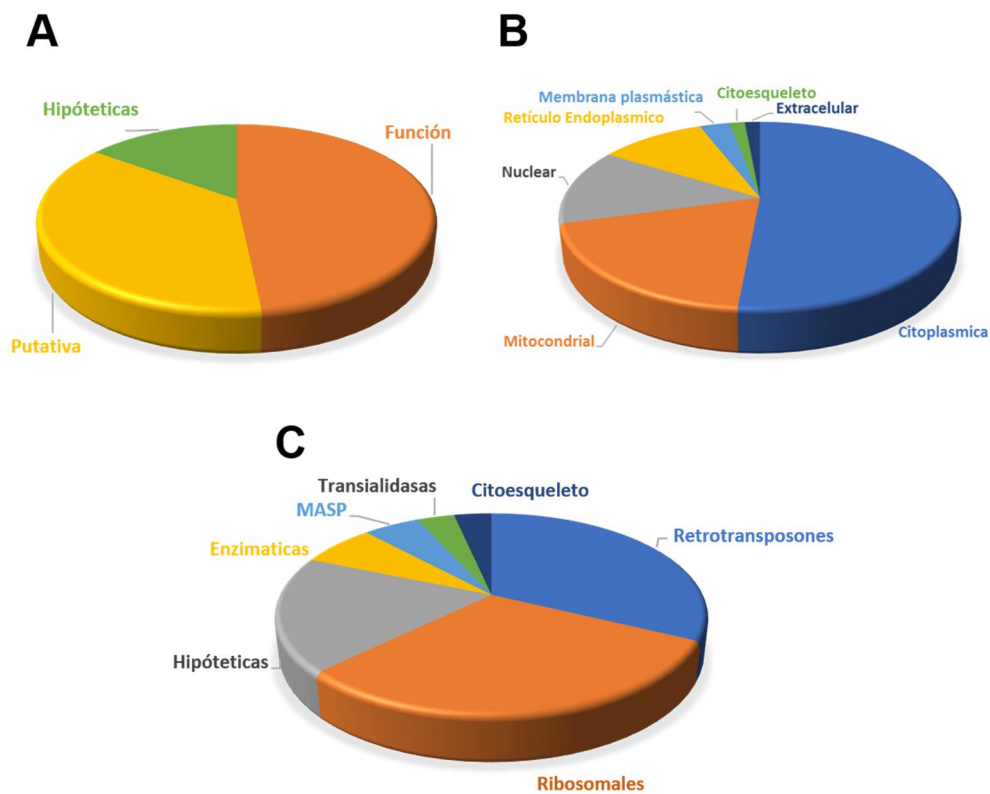


Figura 22. Análisis de función de las proteínas antigénicas de epimastigotes. A) Anotación funcional de las proteínas identificadas en epimastigotes reconocidas por anticuerpos IgG de humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación. **B)** Identificación de posible localización celular de las proteínas antigénicas de epimastigotes. Citoplasmica (51.47%), Mitocondrial (19.12%), Nuclear (13.24%), Reticulo Endoplasmico (10.29%), Membrana plasmática (2.94%), Citoesqueleto (1.47%), Extracelular (1.47%). **C)** Determinación de la función de las proteínas de epimastigote inmunoprecipitadas donde se observan proteínas hipotéticas (18.33%), proteínas ribosomales (30%), proteínas enzimáticas (6.67%), MASP (5.00%), proteínas que forman parte del citoesqueleto (3.33%), transialidasas (33.33%), proteína glicosomal (1.67%) y en su mayoría encontramos secuencias que pertenecen a retrotransposones (31.67%).

Una vez que se contaba con la secuencia de las proteínas de epimastigotes reconocidas por los sueros humanos reactivos a *T. cruzi*, procedimos a la identificación de epítomos en ellas mediante la base de datos ABCpred. Este análisis indicó que todas las proteínas presentaban posibles sitios de reconocimientos antigénico, prediciéndose un total de 1541 epítomos totales con un valor de predicción superior 0.51, en donde 1 es el valor máximo. Acotamos los resultados quedándonos sólo con las secuencias con valores superiores a 0.8 para quedarnos con aquellos epítomos con mejor *score*, identificándose 721 epítomos posibles, presentes en 41 proteínas. Al hacer un análisis de las secuencias encontradas con la base de datos de NCBI, encontramos que los epítomos predichos presentaban más del 80% de similitud con otros tripanosomátidos (**Tabla 11**), o con otros microorganismos (**Tabla 12**), indicativo de una alta probabilidad de mostrar reacción cruzada.

Tabla 11. Alineamiento de un epítipo predicho de epimastigotes. El epítipo presentó más de 0.8 de valor de predicción, el alineamiento muestra que esta secuencia tiene más del 80% de identidad con otros tripanosomátidos.

ANOTACIÓN	COBERTURA %	VALOR DE e	IDENTIDAD	ACCESO (NCBI)
40S ribosomal protein S16, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	100%	1.00E-07	100%	EKG06567.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	100%	1.00E-07	100%	XP_812797.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c]	100%	1.00E-07	100%	ESS69949.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma rangeli</i>]	93%	1.00E-06	100%	ESL05263.1
hypothetical protein [<i>Trypanosomatidae</i> sp.]	100%	2.00E-05	88%	AGG11527.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma vivax</i>]	100%	2.00E-05	88%	CCC48744.1
40S ribosomal protein S16, putative [<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>]	100%	3.00E-05	88%	XP_011774409.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Leishmania braziliensis</i>]	100%	3.00E-05	88%	XP_001562321.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Leishmania mexicana</i>]	100%	3.00E-05	88%	XP_003876388.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Leishmania infantum</i>]	100%	3.00E-05	88%	XP_001470429.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma brucei brucei</i>]	100%	3.00E-05	88%	XP_845728.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Leptomonas seymouri</i>]	100%	3.00E-05	88%	KPI82397.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma theileri</i>]	100%	5.00E-05	88%	ORC87595.1
putative 40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma congolense</i>]	100%	5.00E-05	88%	CCC91274.1
40S ribosomal protein S16 [<i>Trypanosoma grayi</i>]	100%	9.00E-05	88%	XP_009309260.1

Tabla 12. Alineamiento de epítomos predicho de epimastigotes que presenta más del 80% de identidad con otros microorganismos.

ANOTACIÓN	COBERTURA %	VALOR DE e	IDENTIDAD	ACCESO (NCBI)
hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	100%	2.00E-08	100%	XP_810790.1
hypothetical protein BCY84_13369 [Trypanosoma cruzi cruzi]	100%	2.00E-08	100%	PBJ73922.1
hypothetical protein TCDM_01352 [Trypanosoma cruzi Dm28c]	100%	2.00E-08	100%	ESS69909.1
hypothetical protein TCSYLVI0_002363 [Trypanosoma cruzi]	100%	2.00E-08	100%	EKG06527.1
hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	100%	1.00E-06	94%	XP_812414.1
hypothetical protein MOQ_001082 [Trypanosoma cruzi marinkellei]	100%	1.00E-06	94%	EKF38707.1

Estos resultados muestran que los sueros reactivos a *T. cruzi* detectan diversas proteínas antigénicas de epimastigotes del parásito, pero con un alto riesgo de tener reacción cruzada con antígenos similares de otros microorganismos.

8.4.4. Inmunoprecipitación y detección de antígenos de tripomastigotes

Continuando con la caracterización antigénica de nuestros aislados, era importante realizar este análisis antigénico en tripomastigotes, que es el estadio presente en el hospedero mamífero. Similar a los experimentos anteriores (sección 8.4.3), utilizamos una mezcla de proteínas totales, pero en este caso de tripomastigotes, en cantidades 1:1 de cada uno de los 15 aislados (obtenidos en este trabajo y el previo de maestría) y se interaccionaron con la mezcla de los 59 sueros reactivos o con la mezcla de 3 sueros no reactivos como control.

Se identificó un perfil proteico entre los sueros positivos y los sueros negativos en un rango de peso molecular de 10 a 250 KDa (**Figura 23B**). Se observó que ambos perfiles son similares, pero con algunas diferencias en bandas cercanas a los 20 KDa y superiores a 100 KDa en el perfil de reconocimiento antigénico con los sueros reactivos.

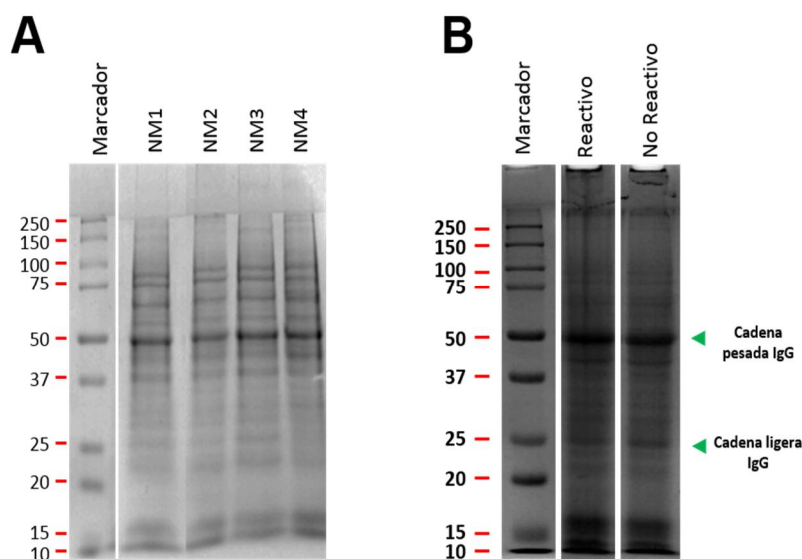


Figura 23. Perfil de inmunoprecipitación de tripomastigotes. **A)** Extractos totales de tripomastigotes de aislados (NM1, NM2, NM3 y NM4) de *T. cruzi*, representativos del total de aislados corridos en geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con azul coomassie, en donde se muestra su integridad. **B)** Perfil antigénico de tripomastigotes de los aislados, identificado mediante inmunoprecipitación con sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi*. Las flechas verdes indican la cadena pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos IgG de humano.

Con la finalidad de identificar a las proteínas inmunoprecipitadas, se realizó un análisis de espectrometría de masas por electro-spray (MS-ESI) de los productos de inmunoprecipitación, tanto de los ensayos con los sueros reactivos como con los no reactivos. Se identificaron un total de 5581 secuencias en promedio de tres experimentos distintos (4241, 6620 y 5884) con los sueros reactivos, y 5019 secuencias en promedio de tres experimentos distintos (3978, 5250 y 5830) con los sueros no reactivos. Al igual que los ensayos anteriores, consideramos entonces únicamente aquellas que tuvieran un valor de proteína ≥ 100 (valor asignado por el sistema utilizando la herramienta SLiMSuite), al menos 4 péptidos reconocidos en la secuencia de la proteína y eliminando secuencias redundantes, dejando únicamente a un representante por grupo. Bajo estos criterios se identificaron un total de 3918 proteínas con sueros reactivos y 2308 con sueros no reactivos. Posteriormente, estos resultados se compararon y se descartaron las secuencias compartidas, consideradas como fondo por ser reconocidas con los sueros no reactivos y así quedarnos solo con las secuencias reconocidas

específicamente por los sueros reactivos. Bajo estos criterios, se identificaron 432 proteínas reconocidas únicamente por los sueros reactivos. Se realizó un análisis de *Gen ontology* usando la herramienta Psort Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>), para conocer la posible localización celular de las secuencias identificadas y se encontró que 204 son citoplásmicas (47.22%), 84 nucleares (19.44%), 51 mitocondriales (11.81%), 44 de Retículo endoplásmico (10.19%), 28 extracelulares (6.48%), 8 de membrana plasmática (1.85%), 5 de Golgi (1.16%), 4 de vacuolares/vesícula secretora (0.93%), 3 de citoesqueleto (0.69%), y una peroxisomal (0.23%). También se realizó una búsqueda de función generalizada donde observamos que la mayoría de las proteínas eran hipotéticas (191/44.21%), seguida de aquellas proteínas con alguna función enzimática (83/19.21%), 31 de unión a ADN/ARN (7.18%), 22 involucradas en algún tipo de transporte (5.09%), 19 retrotransposones (4.40%), 18 nucleasas (4.17%), 14 Mucinas (3.24%), 8 proteínas de Shock térmico (1.85%), 8 proteínas que participan en la fosforilación/defosforilación (1.85%), 8 ribosomales (1.85%), 6 MASP (1.39%), 6 proteínas que participan en la infectividad (1.39%), 5 proteínas de motilidad (1.16%), 5 proteínas de sobrevivencia (1.16%), 5 proteínas con actividad de proteasa (1.16%), y finalmente 3 proteínas involucradas en procesos distintos a los mencionados (0.69%) (**Figura 24**).

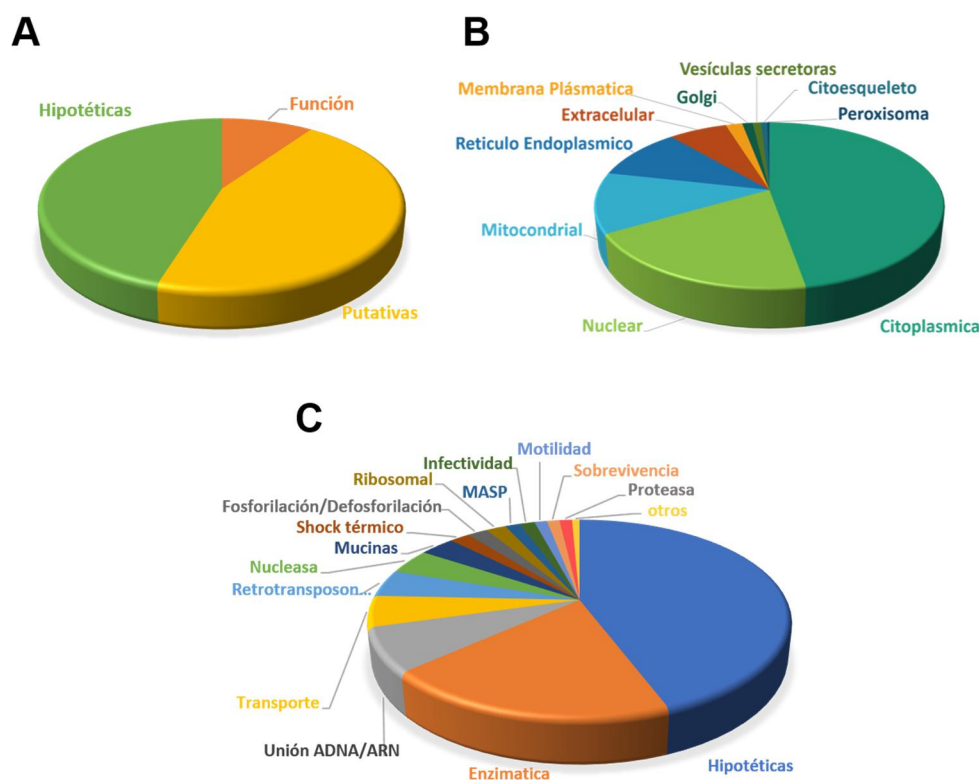


Figura 24. Posible localización celular de las proteínas antigénicas de tripomastigotes. **A)** Anotación funcional de las proteínas identificadas en tripomastigotes reconocidas por anticuerpos IgG de humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación. **B)** Se realizó un análisis *in silico* para determinar la posible localización celular de las proteínas antigénicas de tripomastigotes identificadas median Inmunoprecipitación. El diagrama de pastel muestra que 204 son citoplásmicas (47.22%), 84 nucleares (19.44%), 51 mitocondriales (11.81%), 44 de Reticulo endoplásmico (10.19%), 28 extracelulares (6.48%), 8 de membrana plasmática (1.85%), 5 de Golgi (1.16%), 4 de vacuolares/vesícula secretora (0.93%), 3 de citoesqueleto (0.69%), y una peroxisomal (0.23%). **C)** También se realizó una búsqueda de función generalizada de las 432 proteínas inmunoprecipitadas de tripomastigotes encontrando 191 proteínas hipotéticas (44.21%), 83 proteínas con alguna función enzimática (19.21%), 31 de unión ADN/ARN (7.18%), 22 involucradas en algún tipo de transporte (5.09%), 19 retrotransposones (4.40%), 18 nucleasas (4.17%), 14 Mucinas (3.24%), 8 proteínas de Shock térmico (1.85 %), 8 proteínas que participan en la fosforilación/defosforilación (1.85%), 8 ribosomales (1.85%), 6 MASP (1.39%), 6 proteínas que participan en la infectividad (1.39%), 5 proteínas de motilidad (1.16%), 5 proteínas de sobrevivencia (1.16%), 5 proteínas con actividad de proteasa (1.16%), y finalmente 3 proteínas involucradas en otros procesos distintos a los antes mencionados (0.69%)

Posteriormente se realizó la identificación de epítomos mediante la base de datos ABCpred. Este análisis indicó que todas las proteínas presentaban posibles sitios de reconocimientos antigénico, prediciéndose un total de 18, 723 epítomos con un valor de predicción superior 0.51, siendo 1 el valor máximo. Acotamos los resultados quedándonos sólo con las secuencias con valores superiores a 0.8, disminuyendo la identificación a 8170 epítomos posibles en 428 proteínas de las 432 proteínas totales.

Con el objetivo de encontrar las proteínas antigénicas inmunodominantes, se tomaron en consideración dos características más. Por un lado, el enriquecimiento del conjunto de determinantes antigénicos, es decir, aquellos epítomos más representados en los 8 170 totales (**Tabla 13**). Y, por otro, aquellas proteínas que contarán con el mayor número de epítomos predichos en su secuencia (**Tabla 14**).

Tabla 13. Número de veces que se repiten los epítomos identificados en 428 proteínas de tripomastigotes de *T. cruzi*, inmunoprecipitadas con sueros humanos reactivos al parásito.

NÚM. VECES	NÚM. EPÍTOMOS
11	1
10	1
8	2
6	1
5	2
4	8
3	17
2	240
1	7554

Observamos que uno de los epítomos se repetía 11 veces y fue identificado en 11 proteínas distintas, mientras que, otro de ellos se repetía 10 veces a lo largo de una misma secuencia (**Figura 25**). Dentro de las frecuencias encontradas para el resto de los epítomos tenemos: 1 epítomo 6 veces, 2 epítomos 5 veces, 4 epítomos 8 veces, 3 epítomos 17 veces, 2 epítomos 240 veces y en la mayoría de los casos (7554), se encontró que las secuencias de los determinantes antigénicos eran únicas (**Tabla 13**).

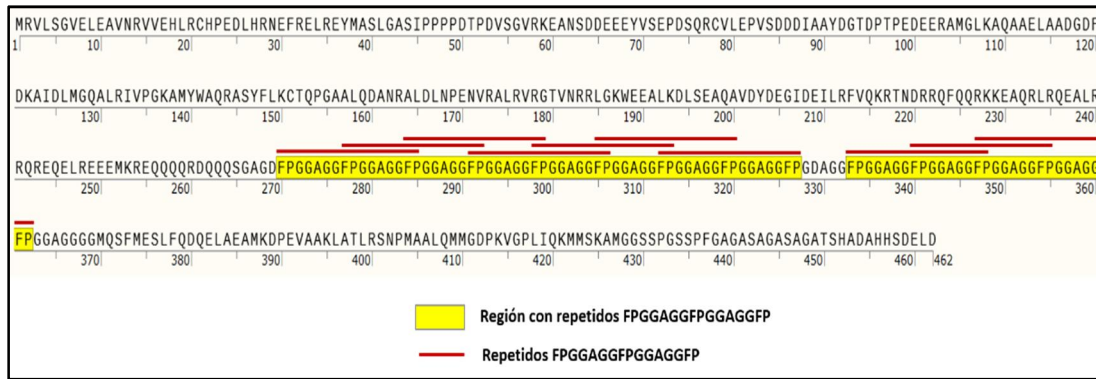


Figura 25. Proteína de tripomastigote con repetidos antigénicos a lo largo de su secuencia. Mediante un análisis *in silico* se encontraron repetidos de un determinante antigénico (FPGGAGGFPGGAGGF), en una secuencia de tripomastigotes de *T. cruzi*. La proteína fue hallada mediante ensayos de inmunoprecipitación utilizando sueros humanos reactivos al parásito (Acceso NCBI: [XP_811491.1](#)).

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de las 428 proteínas, en las que se determinaron epítomos con valores predictivos ≥ 8.0 , con el fin de identificar cuáles de ellas son los mejores candidatos antigénicos reconocidos por los anticuerpos IgG de humano, se observó que en la mayoría de las proteínas de tripomastigote (326) se encontraron más de 10 sitios candidato a determinantes antigénicos (**Tabla 15**). Es de llamar la atención que una de las proteínas tiene un alto número de epítomos, razón por la cual ésta podría ser una molécula importante en el reconocimiento antigénico durante la infección por *T. cruzi* en humanos.

Tabla 14. Número de epítomos con valor predictivo mayor a 0.8. Agrupación de epítomos presentes en proteínas inmunoprecipitadas de tripomastigotes de los aislados de *T. cruzi* de acuerdo con el valor predictivo.

NÚM. EPITOPOS	NÚM. DE PROTEÍNAS	NÚM. EPITOPOS	NÚM. DE PROTEÍNAS
138	1	27	8
79	2	26	8
72	1	25	8
57	1	24	9
52	2	23	13
51	1	22	8
50	3	21	13
49	2	20	9
48	1	19	15
47	1	18	6
46	1	17	20
45	4	16	14
43	3	15	11
42	3	14	19
41	3	13	19
40	1	12	19
39	5	11	24
38	4	10	16
37	4	9	17
36	2	8	22
35	3	7	12
34	5	6	15
33	3	5	16
32	3	4	10
31	5	3	5
30	6	2	3
29	9	1	2
28	8	-	-

Dados los hallazgos encontrados, se realizaron alineamientos de las secuencias de la proteína en la que se encontraron los repetidos antigénicos, y de la proteína que presenta el alto número de epítomos. Los resultados obtenidos para la primer proteína, identificada como una proteína hipotética de interacción con Hsc70 (XP_811491.1) de *T. cruzi*, se resumen en la **Tabla 14**. Se puede observar que se trata de una secuencia

altamente conservada entre tripanosomátidos, por lo que no podría ser un buen candidato para ser utilizada como marcador biológico en la ECh.

Tabla 15. Alineamiento realizado a la proteína XP_811491.1 de tripomastigotes con repetidos antigénicos.

DESCRIPTION	QUERY COVER	E VALUE	IDENT	ACCESSION
Hsc70-interacting protein (Hip) [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	100%	0	100%	XP_811491.1
Hsc70-interacting protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>]	100%	0	77%	EKF33114.1
Hsc70-interacting protein [<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c]	90%	0	96%	ESS68223.1
Hsc70-interacting protein (HIP) [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	90%	0	96%	PBJ72894.1
Hsc70-interacting protein [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	90%	0	96%	XP_818820.1
Hsc70-interacting protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	59%	0	98%	EKF98401.1
putative Hsc70-interacting protein (Hip) [<i>Trypanosoma congolense</i>]	66%	3.00E-80	55%	CCC89895.1
Hsc70-interacting protein (Hip), putative [<i>Trypanosoma equiperdum</i>]	66%	3.00E-78	62%	SCU64296.1
Hsc70-interacting protein (Hip) [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	66%	1.00E-77	62%	XP_844124.1
Hsc70-interacting protein (Hip), putative [<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>]	66%	1.00E-77	62%	XP_011772551.1
putative Hsc70-interacting protein (Hip) [<i>Trypanosoma vivax</i>]	82%	1.00E-76	51%	CCC47301.1
putative Hsc70-interacting protein (Hip) [<i>Trypanosoma theileri</i>]	67%	4.00E-72	61%	ORC90085.1

Los resultados del alineamiento de la proteína que posiblemente contiene 183 epítomos, identificada como una ubiquitin ligasa de *T. cruzi* (XP_810457.1), se muestran en la **Tabla 15**. Se puede apreciar que es una proteína conservada en tripanosomátidos, pero que cuenta con bajos porcentajes de identidad. Sin duda, al tratarse de una ubiquitin ligasa es una proteína altamente conservada en los sistemas eucariontes en general (Hershko, Heller et al. 1983, Platta, El Magraoui et al. 2009, Gualdrón-López, Chevalier

et al. 2013, Rojas, Koszela et al. 2017). Motivo por el cual decidimos realizar un alineamiento de la secuencia que contiene los epítomos.

Tabla 16. Alineamiento de la proteína XP_810457.1 de tripomastigote.

DESCRIPTION	QUERY COVER	E VALUE	IDENT	ACCESSION
ubiquitin-protein ligase-like [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	100%	0	100%	XP_810457.1
ubiquitin-protein ligase-like [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	100%	0	98%	PBJ74418.1
ubiquitin-protein ligase [<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c]	100%	0	98%	ESS63862.1
ubiquitin-protein ligase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	100%	0	98%	EKF99292.1
ubiquitin-protein ligase-like, putative [<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>]	100%	0	94%	EKF27941.1
ubiquitin-protein ligase [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei]	97%	0	38%	XP_846993.1
ubiquitin-protein ligase, putative [<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>]	97%	0	39%	XP_011775448.1
putative ubiquitin-protein ligase [<i>Trypanosoma congolense</i>]	98%	0	52%	CCC91928.1
putative ubiquitin-protein ligase-like [<i>Trypanosoma grayi</i>]	22%	0	73%	XP_009315571.1
putative ubiquitin-protein ligase-like [<i>Trypanosoma theileri</i>]	68%	0	78%	ORC86511.1
ubiquitin-protein ligase, putative, (fragemnt) [<i>Trypanosoma vivax</i>]	74%	0	82%	CCC49496.1

Se agruparon los epítomos por rango de predicción, para identificar aquellas proteínas con mayor probabilidad de ser buenas candidatos antigénicos. Se formaron cuatro grupos: el primero conformado por 148 epítomos con valores predictivos en un rango de 0.98-0.95, presentes en 117 proteínas; el segundo grupo con 1484 epítomos en un rango de 0.94-0.90 en 387 proteínas; el tercer grupo, que contenía 2850 epítomos en un rango de 0.89-0.85 contenido en 419 proteínas; el cuarto grupo, conformado por 3688 epítomos en un rango de 0.84-0.80, presentes en 427 proteínas (**Figura 26**).

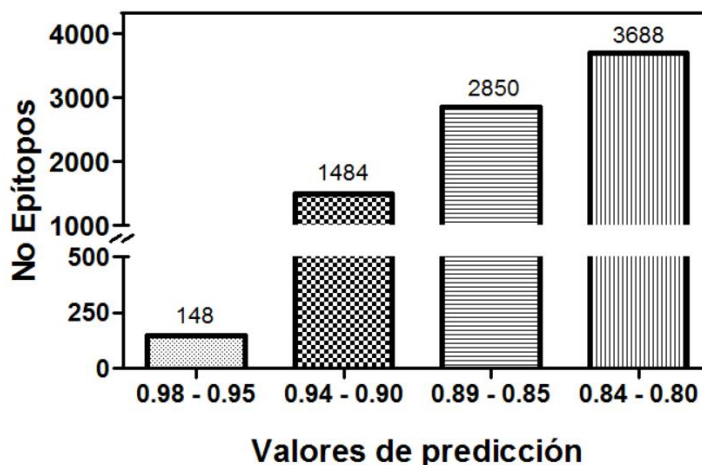


Figura 26. Grupos de epítopos de acuerdo con su valor predictivo. Se agruparon 1870 epítopos con valores predictivos ≥ 0.80 , que fueron organizados de acuerdo con sus valores predictivos. Se obtuvieron cuatro grupos: grupo 1 con 148 epítopos, grupo 2 con 1484 epítopos, grupo 3 con 2850 epítopos, y grupo cuatro con 3688.

De las proteínas que contienen los mayores niveles de valores predictivos de epítopos (≥ 0.90), seleccionamos 4 posibles candidatos para su evaluación experimental en experimentos futuros. Para ello consideramos tres criterios: 1) que tuvieran valor de predicción de epítopos mayor a 0.90, 2) que no tuvieran alta homología con otros tripanosomátidos, microorganismos, y otros eucariontes, y 3) que se encontraran en al menos dos, de los tres experimentos independientes realizados. De esta manera las proteínas candidato que seleccionamos corresponden a una proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina (Q4CRX2), una proteasa de superficie (Q4CPF0), y dos proteínas no caracterizadas (Q4DJ00 y Q4DX97) (**Tabla 17**).

Tabla 17. Proteínas seleccionadas por MVPE, homología y reproducibilidad.

ACCESO (UNIPROT)	ANOTACIÓN	MVPE	COMPONENTE CELULAR	GEN	PM (KDA)	MUESTRAS
Q4CRX2	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina	0.95	Citoplásmico	GN=Tc00.1047053503 449.30	55.72	R1, R2, R3
Q4CPF0	Proteasa de superficie GP63, putativa	0.93	Nuclear	GN=Tc00.1047053509 483.10	36.73	R2, R3
Q4DJ00	Proteína no caracterizada	0.93	Nuclear	GN=Tc00.1047053511 287.110	37.65	R1, R2, R3
Q4DX97	Proteína no caracterizada	0.94	Nuclear	GN=Tc00.1047053506 945.10	36.54	R1, R2, R3

MVPE= Mayor Valor predictivo de epítopo; PM= Peso molecular

De las 117 proteínas, que son las que comprenden los más altos valores de predicción de epítomos (0.98-0.95), realizamos tres posibles grupos de selección para identificar a los mejores candidatos antigénicos. En el primer grupo seleccionamos a las proteínas de acuerdo con su posible localización celular, quedándonos con 11 proteínas que se encontraban de forma extracelular o en membrana plasmática (**Tabla 18**). De las proteínas comprendidas en este grupo, dos de ellas son mucinas TcMUCII (Q4E046 y Q4D4I2), dos MASP (*mucin associated Surface protein*; Q4E2A9 y Q4E4W8), una transialidasa (Q4D9H3), una ubiquitin ligasa (Q4D7V1), una lipasa (Q4CQ28), una Subunidad de oligosacariltransferasa (Q4D2C9), una alpha-1,2-Manosidasa (Q4DC56), una NADH-citocromo b5 reductasa (Q4DYC3) y una proteína no caracterizada (Q4CY87).

Tabla 18. Proteínas extracelulares o de membrana plasmática con MVPE 0.98-0.95.

ACCESO (UNIPROT)	ANOTACIÓN	MVPE	COMPONENTE CELULAR	PM (KDA)	GEN	MUESTRA
Q4E046	Mucina TcMUCII, putativa	0.98	Extracelular	24.43	GN=Tc00.104705350 6501.40	R2
Q4D4I2	Mucina TcMUCII, putativa	0.96	Extracelular	23.84	GN=Tc00.104705350 8745.40	R3
Q4D7V1	Ubiquitin proteína ligasa-like, putativa	0.96	Membrana Plasmática	461.79	GN=Tc00.104705350 8971.50	R3
Q4D9H3	Trans-sialidasa, putativa	0.96	Membrana Plasmática	86.59	GN=Tc00.104705350 8717.60	R2
Q4E2A9	Proteína de superficie asociada a mucina (MASP), putativa	0.96	Extracelular	38.13	GN=Tc00.104705351 1603.300	R1
Q4CQ28	Lipasa, putativa	0.95	Extracelular	39.79	GN=Tc00.104705351 0681.30	R3
Q4CY87	Proteína no caracterizada	0.95	Membrana Plasmática	93.69	GN=Tc00.104705351 0001.20	R1
Q4D2C9	Subunidad de oligosacariltransferasa, putativa	0.95	Membrana Plasmática	91.38	GN=Tc00.104705350 5163.80	R2 R3
Q4DC56	alpha-1,2-Manosidasa	0.95	Extracelular	69.3	GN=Tc00.104705350 8317.80	R1
Q4DYC3	NADH-citocromo b5 reductasa	0.95	Extracelular	32.38	GN=Tc00.104705351 1817.40	R1
Q4E4W8	Proteína de superficie asociada a mucina (MASP), putativa	0.95	Extracelular	26.93	GN=Tc00.104705351 1255.670	R2

MVPE= Mayor Valor predictivo de epítomo; PM= Peso molecular.

El segundo grupo fue seleccionado basándonos en su hallazgo en los tres experimentos independientes, quedando un total de 7 proteínas: espermidina (Q4CXJ6), un inhibidor de ribonucleasa (Q4DLI2), una proteína de transporte de la familia Sec1 (Q4E2E3), una proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina (Q4CRX2), una proteína de choque térmico HSP-70 (Q4CL09), una proteína de interacción con Hsc-70 (Q4DAT6), y una metalopeptidasa de zinc (Q4E5H7) (**Tabla 19**).

Tabla 19. Proteínas halladas en tres experimentos independientes con MVPE \geq 0.95.

ACCESO (UNIPROT)	ANOTACIÓN	MVPE	COMPONENTE CELULAR	PM (KDA)	GEN	MUESTRA
Q4CXJ6	Espermidina sintasa putativa	0.96	Citoplasma	33.48	GN=Tc00.10470 53510337.40	R1 R2 R3
Q4DLI2	Inhibidor de ribonucleasa L putativa	0.96	Citoplasma	73.78	GN=Tc00.10470 53508637.150	R1 R2 R3
Q4E2E3	Proteína de transporte de la familia Sec1 putativa	0.96	Citoplasma	69.6	GN=Tc00.10470 53509979.60	R1 R2 R3
Q4CRX2	Proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina	0.95	Citoplasma	55.72	GN=Tc00.10470 53503449.30	R1 R2 R3
Q4CL09	Proteína mitocondrial de shock térmico 70 putativa	0.95	Mitocondria	20.52	GN=Tc00.10470 53432677.0	R1 R2 R3
Q4DAT6	Proteína de interacción con HSC70 putativa	0.95	Citoplasma	48.26	GN=Tc00.10470 53510143.24	R1 R2 R3
Q4E5H7	Metalopeptidasa de zinc dependiente de ATP putativa	0.95	Citoplasma	62.08	GN=Tc00.10470 53511277.170	R1 R2 R3

MVPE= Mayor Valor predictivo de epítipo; PM= Peso molecular.

Como siguiente paso hicimos un análisis de los antígenos que han sido probados experimentalmente y reportados en la literatura. Cabe señalar que no en todos los casos los autores reportan la secuencia del antígeno en estudio, por lo tanto, de los 122 antígenos reportados solo en 91 de los casos encontramos el número de acceso correspondiente a UniProt. De estos últimos antígenos (91), solamente dos de ellos (Q4DCW0/Proteína no caracterizada y Q4E2M9/Glucosa-6-fosfato isomerasa) (Ohyama, Huy et al. 2016) coincidieron con nuestros candidatos seleccionados.

En conjunto, todos los resultados anteriores permitieron aumentar nuestro conocimiento de las cepas que circulan en el estado de Oaxaca, así como de sus características moleculares, biológicas y antigénicas. Además, también establecimos una plataforma de posibles antígenos, sustentada en ensayos de inmunoprecipitación con sueros reactivos al parásito, micro-secuenciación y análisis de secuenciación masiva, que nos permitieron identificar antígenos candidato para futuros experimentos que permitan su validación como buenos antígenos. Estos experimentos, además,

proporcionan una plataforma cuya utilidad va más allá que la hasta ahora evaluada en este trabajo, accesible no sólo para nuestro grupo de investigación, sino también para la comunidad científica interesada en el área.

IX. DISCUSIÓN

La obtención de nuevos aislados de *T. cruzi* permite comprender diferentes aspectos de la genética y biología del parásito; así como, servir de plataforma para realizar estudios futuros, dirigidos a la identificación de moléculas que pudieran ser importantes para la sobrevivencia del parásito, el establecimiento de la patología de la enfermedad en la Chagas en el humano y en la identificación del parásito y la infección. Por lo tanto el estudio de las poblaciones de parásitos que circulan en un territorio determinado proporciona información necesaria para comprender la eco-epidemiología de la enfermedad (Zingales, Miles et al. 2012).

A pesar de su importancia es poco lo que se sabe de las cepas de parásitos presentes en México. Por lo tanto, en este trabajo obtuvimos aislados de *T. cruzi* circulantes en una zona endémica del país, para realizar su posterior genotipificación, y caracterización biológica y antigénica. Los aislados fueron obtenidos a partir de heces de triatomíneos con infección natural con *T. cruzi* colectados en el Estado de Oaxaca, que es una región altamente endémica de la infección por *T. cruzi* y de la enfermedad de Chagas en México, y que a pesar de ello han sido obtenidos y estudiados muy pocos aislados del parásito (Cruz-Reyes and Pickering-Lopez 2006, Carabarin-Lima, Gonzalez-Vazquez et al. 2013).

Se aislaron ocho cepas de *T. cruzi* obteniendo una eficiencia de aislamiento del 80%, valor cercano al obtenido en el trabajo previo (77%) (Martínez Cuevas 2013), pero superior a lo reportado en la literatura en donde se han obtenido eficiencias iguales o menores a un 47% (Valente, da Costa Valente et al. 2009). Lo anterior indica el mejoramiento y adaptación de la técnica de aislamiento y axenización de los cultivos en nuestro laboratorio.

Ya que los triatomíneos pueden estar colonizados por otro tipo de tripanosomátidos diferentes a *T. cruzi*, tales como *T. rangeli* que se encuentran en las glándulas salivales y temporalmente en el intestino del insecto, o *B. triatomae* presente en el aparato digestivo del triatomíneo, fue necesario caracterizar molecularmente los cultivos obtenidos para comprobar la presencia de *T. cruzi*, y proceder entonces con su genotipificación y caracterización biológica y antigénica (Hoare 1972, Añez 1984, Jensen and Schaub 1991,

Guevara, Dias et al. 2005, Dias, Diotaiuti et al. 2007, Naves, da Silva et al. 2017). Esta caracterización mostró que en todos los parásitos aislados correspondían a *T. cruzi*.

La amplificación de las secuencias de IR-miniexón, 24S α rRNA y 18S rRNA mostraron la presencia de los DTUs: TcI, TcII y TcV. Estos resultados contrastan con reportes previos en donde sólo TcI había sido reportado en Oaxaca (Bosseno, Espinoza et al. 2000, Bosseno, Barnabé et al. 2002, Ruiz-Sanchez, Leon et al. 2005, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011). Una posible explicación a estos resultados distintos es que los aislados previamente reportados fueron obtenidos de regiones diferentes del estado (Bosseno, Barnabé et al. 2002), a los obtenidos en este trabajo. Las cepas que han sido reportadas previamente fueron obtenidas (Sba-026, Sba-056, Sba-35 and Jua-022) de los municipios de San Bartolo Coyotopec y Jalapa del Valle, que se encuentran en la región de Valles Centrales (Bosseno, Barnabé et al. 2002). Mientras que, las cepas obtenidas en este trabajo (CI1, CI2, CI3, CI4, SC2, SC3, SC4 y NM5) fueron aisladas de triatomíneos colectados en los municipios de Ciudad Ixtepec, Salina Cruz y Nejapa de Madero, que se encuentran en las regiones del Istmo y Sierra Sur. Estos resultados indican una mayor variedad de DTUs circulantes en Oaxaca, distribuidas en diferentes regiones geográficas del estado. Sin embargo, serán necesarios realizar un mayor número de estudios para conocer todas las DTU circulantes, así como su distribución en el estado.

Al igual que en Oaxaca, en el resto del país también se pensó durante muchos años, que TcI era el único DTU circulante (Bosseno, Espinoza et al. 2000, Ruiz-Sanchez, Leon et al. 2005, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Bosseno, Barnabe et al. 2009, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011) . Sin embargo, en los últimos años se ha identificado la presencia de las otras cinco DTUs (TcII-TcVI), las cuales han sido determinadas directamente en muestras de mamíferos no humanos y de triatomíneos (Ruiz-Sanchez, Leon et al. 2005, Sanchez-Guillen, Lopez-Colombo et al. 2006, Bosseno, Barnabe et al. 2009, Cura, Mejia-Jaramillo et al. 2010, Gomez-Hernandez, Rezende-Oliveira et al. 2011, Ramos-Ligonio, Torres-Montero et al. 2012, Ibanez-Cervantes, Martinez-Ibarra et al. 2013, Martinez, Noguera et al. 2013, Cura, Duffy et al. 2015, Lopez-Cancino, Tun-Ku et al. 2015). Es posible que todas las DTU han estado presentes en el

país, pero considerando el predominio de TcI junto con el bajo número de muestras analizadas, es lo que posiblemente ha llevado a sólo identificar a esta DTU. Ejemplo de esto, es el caso del caso clínico de megasíndrome reportado en Oaxaca hace muchos años (Salazar Schettino, Tay et al. 1984), que es una manifestación clínica asociada con TcII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales, Miles et al. 2012), aunque cabe la posibilidad de que este hallazgo podría ser el resultado de la heterogeneidad presentada por las cepas de TcI, ya que algunos autores han reportado que cepas TcI también pueden causar daño digestivo durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas (DosReis 2011, Martins, Castanho et al. 2014).

Se ha reportado que las co-infecciones o infecciones mixtas de dos o más genotipos del parásito, pueden ocurrir en la naturaleza tanto en los triatomíneos como en los mamíferos, ya sea como resultado de infecciones múltiples secuenciales o simultáneas. Estas infecciones mixtas podrían alterar la severidad de los síntomas, la transmisión de patógenos y la epidemiología de la enfermedad (Ragone, Pérez Brandán et al. 2015). En la literatura, se han reportado co-infecciones de dos, tres e incluso 4 DTUs distintos: TcI y TcV (26.61%), TcV y TcVI (25.81%), TcII y TcV (14.52%), TcI y TcII (13.71%), TcI y TcVI (4.84%), TcII, TcV y TcVI (3.23%), TcII y TcIV (2.42%); TcII y TcVI (2.42%), TcIII y TcV (2.42%), TcI, TcII y TcV (1.61%), TcI, TcIII y TcV (1.61%), TcI, TcII, TcV y TcVI (1.61%), y TcI, TcIII y TcV en menor proporción (0.81%) (Spitzner, de Freitas et al. 2007, del Puerto, Nishizawa et al. 2010, Abolis, Araujo et al. 2011, Valadares, Pimenta et al. 2012, Ibanez-Cervantes, Martinez-Ibarra et al. 2013, Botto-Mahan, Rojo et al. 2015, Monje-Rumi, Brandan et al. 2015). Este comportamiento también se observó en este trabajo, donde identificamos coinfecciones de TcI y TcII (12.5%) y TcI y TcV (37.5%). Curiosamente, la mayoría de los aislados (13 de 15 aislados totales, este trabajo y en el trabajo previo de maestría) pertenecen a TcI, ya sea solos o en una mezcla con otras DTU, lo que demuestra el predominio de TcI y/o su mejor adaptación a las condiciones de cultivo.

Para comprender la relación entre los genotipos de las cepas de *T. cruzi* y la patología que causan en humanos, es necesario realizar la caracterización biológica de las cepas

del parásito. Los resultados indicaron que no existen diferencias en el crecimiento de los aislados, ni en las características morfométricas de sus epimastigotes.

Estos resultados nos indicaban que, nuestros parásitos se habían adaptado adecuadamente a las condiciones de cultivo *in vitro*, empleadas en el laboratorio. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Martinez-Diaz, 2001 #176), aunque existen también algunas reportes en que las cepas analizadas no muestran el mismo comportamiento de crecimiento en cultivo (Rimoldi, Tome Alves et al. 2012). Desafortunadamente, son muy pocos los trabajos en donde se han reportado las curvas de crecimiento de los aislados, por lo que es difícil asociar si las similitudes o diferencias entre sus curvas de crecimiento, es una característica de distintas tasas de crecimiento propias de cada cepa o resultado de la falta de tiempo necesario para que se adapten a las condiciones de cultivo.

Al igual que lo reportado en la literatura (Souza 2009) nosotros también observamos diferencias en el tamaño de los epimastigotes presentes en las heces de triatominos. Por lo tanto, realizamos un análisis morfométrico de los epimastigotes aislados. Los resultados indicaron que no existen diferencias en el tamaño de los epimastigotes de los distintos aislados, una vez que se han adaptado al cultivo. Tampoco observamos diferencias entre los aislados y las cepas de referencia (Y y CL Brener), lo que podría indicar que los epimastigotes de cualquier cepa tienen un tamaño promedio en un rango de 20 a 40 μm de longitud y de 2 a 3 μm de ancho, como se ha reportado en la literatura (Rimoldi, Tome Alves et al. 2012). Los resultados anteriores sugieren que las condiciones micro-ambientales en el intestino del triatomino versus el medio de cultivo, podrían estar influyendo en las diferentes características morfométricas observadas. Posiblemente porque el paso del parásito a través del intestino del insecto, que lo expone a las señales necesarias para llevar a cabo su metaciclo, resulta en la mezcla de epimastigotes, formas intermedias y tripomastigotes metacíclicos, que en conjunto resulta en una variabilidad de formas y tamaños del parásito.

Una de las características biológicas indispensables para que el parásito complete su ciclo biológico, es el proceso de diferenciación hacia las formas infectivas de tripomastigotes (metacíclico y sanguíneo). En la evaluación de la capacidad de

transformación de los aislados, observamos que estos presentan un comportamiento variable. En el caso de la metacicloogénesis, el paso de diferenciación de epimastigotes hacia tripomastigote metacíclico, algunas cepas presentaron un alto porcentaje de diferenciación (NM5), lo que podría estar relacionado con una mejor adaptación a los cambios en el microambiente (Crane and Dvorak 1979, Jimenez 2014, Gonçalves, Ávila et al. 2018), comparados con aquellos parásitos que se diferenciaron en menor proporción (SC3). Este mismo comportamiento ya fue observado otras cepas evaluadas en otros trabajos de investigación, en también se observaron diferencias en su eficiencia de metacicloogénesis (Contreras, Salles et al. 1985, Avendaño, Calderón-Arguedas et al. 2006).

Cuando se evaluó la capacidad de transformación que tienen los epimastigotes hacia tripomastigote sanguíneo (diferenciación extracelular), los resultados indicaron que al igual que en la metacicloogénesis, cada aislado se comporta de manera distinta. Además, no observamos una correlación entre su eficiencia de metacicloogénesis y diferenciación extracelular, observándose que las cepas con mayor porcentaje de transformación extracelular (CI1, CI3, SC3 y la cepa de referencia Y), no fueron las mismas que tuvieron los más altos niveles de metacicloogénesis. Estos resultados sugieren que ambos procesos de diferenciación aparentemente no comparten la misma maquinaria biológica.

En el caso de la capacidad de infección *in vitro* de los aislados, los resultados indicaron que todos ellos son capaces de establecer una infección productiva en un modelo celular de mamífero, pero lo hacen con una diferente eficiencia al igual que lo que se ha reportado para otras cepas del parásito (Lopez-Olmos, Perez-Nasser et al. 1998, Andrade, Campos et al. 2011). Esto concuerda con la amplia variedad de comportamientos biológico observados en las distintas poblaciones del parásito, lo que se ha relacionado a la dificultad en el entendimiento y dilucidación de los mecanismos que determinan el establecimiento y progreso de la infección en el mamífero (Lopez-Olmos, Perez-Nasser et al. 1998, Andrade, Campos et al. 2011).

Al igual que la capacidad de infectividad de los aislados *in vitro*, en el modelo en ratón todos los aislados mostraron diferentes niveles de infectividad. Este mismo comportamiento ha sido reportado para diversas cepas del parásito (Andrade 1974,

Lopez-Olmos, Perez-Nasser et al. 1998, Andrade, Machado et al. 1999, Martinez-Diaz, Escario et al. 2001, Dias, Gruending et al. 2013, Ragone, Pérez Brandán et al. 2015), lo que muestra la variabilidad de sus características biológicas asociadas a su alta diversidad genética intraespecífica (Zingales, Miles et al. 2012)

Se ha sugerido en la literatura que la eficiencia de transformación hacia las distintas formas infectivas del parásito, pudiera ser un sistema de selección para las cepas más infectivas (Jimenez 2014). Sin embargo, nosotros no encontramos una relación entre ambos procesos ya que, las cepas que más se diferenciaron (CI1, CI3, SC3 y la cepa de referencia Y), no fueron las mismas que presentaron mayores porcentajes de infección (SC4 y NM5).

Es interesante analizar el comportamiento de algunos aislados, como es el caso de CI2, que mostró distintas eficiencias de infección entre los dos modelos analizados (*in vitro* e *in vivo*). Una posible explicación a este comportamiento, es que estos parásitos cuentan con una pequeña batería de factores de virulencia, que se sabe que le son necesarios para poderse enfrentar al sistema inmunológico del hospedero mamífero de manera eficiente (DosReis 2011, Flavia Nardy, Freire-de-Lima et al. 2015).

Es importante resaltar, que los modelos experimentales de infección por *T. cruzi*, permiten dilucidar y comprender los mecanismos moleculares que el parásito utiliza para establecer la infección. En especial, con el uso de modelos murinos en el que se ha logrado reproducir algunas características de la infección por *T. cruzi*, como la observada en el humano (Andrade, Machado et al. 1999, Macedo, Machado et al. 2004). Sin embargo, aún no se cuenta con modelos animales eficientes que permitan reproducir la ECh, y por lo tanto es aún escaso el avance en el conocimiento de los factores involucrados en la heterogeneidad clínica de la enfermedad y su relación con la diversidad genética de las cepas del parásito, en el desarrollo de la patología de la enfermedad, en el impacto que la repuesta inmunológica del hospedero ejerce en el parásito y en la identificación de antígenos que pudieran servir como marcadores de detección del parásito y la infección (Kierszenbaum, Fresno et al. 2002, Gutierrez, Guedes et al. 2009, DosReis 2011, Oladiran and Belosevic 2012, Flavia Nardy, Freire-de-Lima et al. 2015).

Continuamos, por tanto, con la caracterización antigénica de los aislados, incluyendo para ello los aislados obtenidos en el trabajo previo de maestría junto con los obtenidos en este trabajo. Los resultados observados en los ensayos de *western blot*, mostraron patrones distintos de reconocimiento entre diferentes aislados y cepas del parásito con los sueros reactivos a *T. cruzi*, reforzando la idea de que cada cepa del parásito presenta un casete antigénico diferente durante la infección al mamífero, como ya se ha propuesto en la literatura (Di Noia, Buscaglia et al. 2002, De Marchi, Di Noia et al. 2011, Mendes, Reis Cunha et al. 2013). En estos ensayos, se observó que se compartía únicamente una banda de aproximadamente 37 KDa en los distintos extractos de tripomastigotes, la cual se analizó por micro-secuenciación. De manera interesante, se ha reportado la identificación y análisis por micro-secuenciación de una banda de peso molecular similar, utilizando extractos totales de epimastigotes (Teixeira, Borges-Pereira et al. 1994, Sanchez, Monteon et al. 2001, Verissimo da Costa, Lery et al. 2013). Comparando nuestros resultados con el obtenido con epimastigotes, reportado en la literatura, identificamos tres proteínas compartidas (Nucleósido fosforilasa/Q4DAD9, deshidrogenasa/Q4DAE1 y ribonucleósido difosfato reductasa/Q4DFS6), las cuales aún no han sido validadas experimentalmente. El hecho de que estas proteínas estén compartidas en ambos estadios del parásito y considerando que los extractos de epimastigotes suele arrojar altos niveles de reacción cruzada con sueros reactivos contra *T. cruzi* (Malchiodi, Chiaramonte et al. 1994), pensamos que estas tres proteínas no serían buenos candidatos para estudios posteriores. Además, cuando analizamos estos resultados con los obtenidos en los ensayos de inmunoprecipitación usando los sueros reactivos y extractos totales de proteínas de tripomastigotes ligados a micro-secuenciación, no se encontró a ninguna de estas tres proteínas, lo que apoya que no serían buenos candidatos para estudios posteriores.

En cuanto a los resultados encontrados en la inmunoprecipitación de proteínas de epimastigotes, el análisis *in silico* de sus secuencias mostraron una alta homología con proteínas de otros microorganismos lo que resultaría en altos niveles de reacción cruzada. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, en donde efectivamente se ha observado que las proteínas de epimastigotes suelen presentar reacción cruzada con proteínas de otros tripanosomátidos, parásitos endémicos de las mismas zonas y

proteínas del hospedero (Verissimo da Costa, Lery et al. 2013, Novaes, Goncalves et al. 2016).

Los ensayos de inmunoprecipitación con la mezcla de extractos totales de tripomastigotes de los aislados (15) y la mezcla de sueros reactivos al parásito (59) ligados a micro-secuenciación, identificaron un total de 432 proteínas de tripomastigotes que no fueron encontrados con los sueros no reactivos y que cumplieron los criterios de selección (un valor de proteína mayor a 100, que presentaran al menos 4 péptidos en su secuencia, y eliminando secuencia redundantes dejando sólo a un representante). El análisis de localización celular de estas proteínas fue muy variada desde: citoplásmicas, nucleares, mitocondriales, de retículo endoplásmico, extracelulares, membrana plasmática, Golgi, vacuolares y vesículas secretoras, citoesqueleto y peroxisomas. Esta localización tan diversa de proteínas antigénicas reconocidas, concuerda con las que se han encontrado en otros trabajos, en donde al igual que nosotros, el mayor porcentaje corresponde a proteínas con una localización citoplásmicas (Ibanez, Affranchino et al. 1988, Hoft, Kim et al. 1989, Lafaille, Linss et al. 1989, Levin, Mesri et al. 1989, Frasch and Reyes 1990, Kerner, Liegeard et al. 1991, Burns, Shreffler et al. 1992, Cetron, Hoff et al. 1992, Gruber and Zingales 1993, Peralta, Teixeira et al. 1994, Aznar, Lopez-Bergami et al. 1995, Cotrim, Paranhos-Baccala et al. 1995, Umezawa, Nascimento et al. 1996, Breniere, Yaksic et al. 1997, Oliveira, Broude et al. 1998, Houghton, Benson et al. 1999, Buchovsky, Campetella et al. 2001, Breniere, Bosseno et al. 2002, Marcipar, Roodveldt et al. 2005, Campo, Buscaglia et al. 2006, Diez, Gea et al. 2006, Camussone, Gonzalez et al. 2009, Bhattacharyya, Brooks et al. 2010, Russomando, Sanchez et al. 2010, Fabbro, Olivera et al. 2011, Gil, Cimino et al. 2011, Bottino, Gomes et al. 2013, Oliveira, Kuehn et al. 2013, Verissimo da Costa, Lery et al. 2013, Yao, Zheng et al. 2013, Carmona, Nielsen et al. 2015, Ohyama, Huy et al. 2016).

Para la selección de posibles proteínas antigénicas, que pudieran ser buenos candidatos para estudios futuros de selección de marcadores biológicos para la identificación del parásito, la infección y la enfermedad, generamos una plataforma de 8170 antígenos comprendidos en 428 proteínas que cumplieron los criterios de selección (valor predictivo mayor a 0.8). De este total de antígenos fue necesario seleccionar

aquellos que cumplían con diferentes criterios que permitieron su clasificación en tres grupos, quedándonos con un total de 24 proteínas candidato. Este análisis, además, permitiría validar los resultados obtenidos del ensayo de inmunoprecipitación-ligado a espectrometría de masas, con lo reportado en la literatura. En donde esperaríamos encontrar coincidencias, indicativas de que nuestros ensayos son correctos. De las 24 proteínas candidato solo encontramos 2 de ellas (Q4DCW0 y Q4E2M9) en la literatura, las cuales fueron identificadas mediante espectrometría de masas en el inmunoproteoma del parásito de la cepa Sylvio (Tcl) (Ohyama, Huy et al. 2016) lo que valida nuestros resultados. De las 22 proteínas restantes, 19 de ellas tienen una anotación en el genoma y 3 están anotadas como hipotéticas. Además, poco se ha descrito en la literatura de estas proteínas candidato o de integrantes de las mismas familias, como se describe a continuación.

De nuestras proteínas candidato, primero analizamos aquellas con una localización en superficie, debido a que serían las primeras vistas por el sistema inmune, y porque se han reportado en la literatura diversas proteínas de superficie como buenos antígenos para el reconocimiento indirecto del parásito (Hoft, Kim et al. 1989, Frasch and Reyes 1990, Gruber and Zingales 1993, Peralta, Teixeira et al. 1994, Camussone, Gonzalez et al. 2009, Russomando, Sanchez et al. 2010). Nosotros encontramos dos mucinas del grupo II, de los cuales ya se ha reportado otra proteína de este grupo como buen antígeno llamada TSSA. Se ha visto que esta proteína permite diferenciar en dos grandes grupos a los DTU's del parásito, debido a que reconoce de manera específica a sus dos isoformas, las cuales se expresan diferencialmente en las distintas cepas del parásito (TSSAI: TcI, TcIII y TcIV; TSSAII: TcII, TcV y TcVI), además de que no presenta reacción cruzada con otros microorganismos (Di Noia, Buscaglia et al. 2002, Bhattacharyya, Brooks et al. 2010). Estos antecedentes apoyan la propuesta de que las proteínas encontrada en este estudio (Q4E046 y Q4D4I2) pudieran ser utilizadas en análisis posteriores para evaluar su potencial como buenos antígenos para la detección indirecta del parásito.

Otra de las proteínas antigénicas candidato (Q4E5H7) corresponde a una metaloproteínasa (MMP). Se ha observado que las MMP de humano se expresan en altos

niveles en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica en comparación a los pacientes con cardiomiopatía no chagásica, siendo por tanto propuestas como posible biomarcadores (Bautista-Lopez, Morillo et al. 2013). Hasta el momento no se han evaluado las MMP del parásito como antígenos, sin embargo se sabe que éstos juegan un papel importante durante el proceso de infección (Marino, Silva et al. 2003, Castillo, Lopez-Munoz et al. 2012, Duaso, Yanez et al. 2012).

Finalmente, también encontramos a una HSP70 (Q4DAT6) que no ha sido estudiada directamente en la literatura, pero otra proteína de la misma familia ha mostrado ser un buen candidato para la detección indirecta de *T. cruzi* en individuos infectados en fase crónica de la enfermedad (Krautz, Peterson et al. 1998).

Diversos reportes han mostrado que la diversidad genética del parásito tiene un gran impacto en sus características epidemiológicas, biológicas, antigénicas y patológicas (Tibayrenc 2010). Por lo tanto, es indispensable caracterizar los genotipos de *T. cruzi* que circulan en determinadas áreas geográficas y en sus hospederos, para la mayor comprensión de la eco-epidemiología de ECh y un mejor entendimiento de los sistemas epidemiológicos.

Por lo tanto, el aislamiento y caracterización molecular, biológica y antigénica de aislados de *T. cruzi* autóctonos de Oaxaca analizados en este estudio, así como la generación de una plataforma de antígenos de las cepas que circulan en el estado, contribuyen significativamente en un mayor conocimiento de la eco-epidemiología de la infección de *T. cruzi* en Oaxaca y sin duda sientan las bases necesarias para estudios futuros.

X. RESUMEN DE RESULTADOS.

Se obtuvieron 8 aislados de *T. cruzi* provenientes de su vector triatomino, capturados en el Estado de Oaxaca.

La genotipificación de los aislados nos permitió confirmar la presencia de TcI, siendo la DTU más predominante. Así mismo, encontramos por primera vez a TcV y TcII presentes en Oaxaca (datos conjuntos de los resultados previos y este trabajo).

Se identificó la presencia de co-infecciones dadas por TcI y TcV, así como de TcI y TcII, al encontrar dos subpoblaciones con marcadores moleculares para ambos genotipos en una misma población.

Los resultados de la caracterización biológica nos indican que las cepas tienen propiedades infectivas distintas.

Los ensayos de inmunoprecipitación de proteínas de tripomastigotes ligados a espectrometría de masas, utilizando sueros humanos reactivos al parásito, permiten identificar un amplio número de proteínas antigénicas de *T. cruzi*.

Las proteínas antigénicas de epimastigotes identificadas, no son buenos candidatos como marcadores biológicos a la detección de la infección por *T. cruzi*, por compartirse con otros tripanosomátidos y otros microorganismos.

XI. CONCLUSIÓN.

Cepas de *T. cruzi*, autóctonas del estado de Oaxaca, muestran variabilidad genética, biológica y antigénica.

XII. PERSPECTIVAS.

1. Clonación de las secuencias candidato seleccionadas de acuerdo con los valores predictivos de epítomos, localización celular, reproducibilidad, homología con otros organismos: proteínas no caracterizadas (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87 y Q4DCW0), mucinas TcMUCII (Q4E046y Q4D4I2), MASP (Q4E2A9 y Q4E4W8), proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina (Q4CRX2), proteasa de superficie (Q4CPF0), transialidasa (Q4D9H3), ubiquitin ligasa (Q4D7V1), lipasa (Q4CQ28), subunidad de oligosacaryltransferasa (Q4D2C9), alpha-1,2-Manosidasa (Q4DC56), NADH-citocromo b5 reductasa (Q4DYC3), espermidina (Q4CXJ6), inhibidor de ribonucleasa (Q4DLI2), proteína de transporte de la familia Sec1 (Q4E2E3), proteína de choque térmico HSP-70 (Q4CL09), proteína de interacción con Hsc-70 (Q4DAT6), metalopeptidasa de zinc (Q4E5H7), y Glucosa-6-fosfato isomerasa (Q4E2M9)
2. Obtención de las proteínas recombinantes fusionadas a banderas de GST o Histidinas.
3. Evaluación de las proteínas candidato, solas y en conjunto, con sueros humanos reactivos a *T. cruzi*, provenientes de Oaxaca y otros estados del país.
4. Evaluación de las proteínas candidato, solas y en conjunto con sueros provenientes de distintas zonas endémicas de Latinoamérica.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abolis, N. G., S. M. Araujo, M. J. Toledo, M. A. Fernandez and M. L. Gomes (2011). "*Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines." Acta Trop **120**(3): 167-172.

Aguilar, R. A., B. Nogueira Torres, M. Cortéz Jiménez, J. Jurberg, C. Galvão and R. Carcavallo (1999). "*Triatoma bassolsae* sp. n. do México, com uma chave para as espécies do complexo "phyllosoma" (Hemiptera, Reduviidae)." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **94**: 353-359.

Almeida, I. C., D. T. Covas, L. M. Soussumi and L. R. Travassos (1997). "A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection." Transfusion **37**(8): 850-857.

Andersson, J., A. Orn and D. Sunnemark (2003). "Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes." Immunol Lett **86**(2): 207-212.

Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (1999). "Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice." Mol Biochem Parasitol **100**(2): 163-172.

Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (2002). "*Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations." Exp Parasitol **100**(4): 269-275.

Andrade, S. (1974). "Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio)." Revista de Patologia Tropical **3**: 65-121.

Andrade, S. G. (1985). "Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains." Rev Soc Bras Med Trop **18**: 36-49.

Andrade, S. G., R. F. Campos, M. Steindel, M. L. Guerreiro, J. B. Magalhaes, M. C. Almeida, J. N. Reis, V. C. Santos, H. M. Valadares, M. G. Reis and A. M. Macedo (2011). "Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009)." Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(8): 948-956.

Andrade, S. G. and J. B. Magalhães (1997). "Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **30**: 27-35.

Andrade, V., C. Brodskyn and S. Andrade (1983). "Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*." Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **76**: 796-799.

Antas, P. R. Z., E. N. Azevedo, M. R. M. P. Luz, N. Medrano-Mercado, A. C. L. Chaves, P. G. Vidigal, Â. C. Volpini, Á. J. Romanha and T. C. Araújo-Jorge (2000). "A reliable and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the capture of IgM from human chagasic sera using fixed epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Parasitology Research **86**(10): 813-820.

Añez, N. (1984). "Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. VII - Its effect on the survival of infected triatomine bugs." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **79**: 249-255.

Araujo, F. G. and D. Guptill (1984). "Use of Antigen Preparations of the Amastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* in the Serology of Chagas's Disease*." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **33**(3): 362-371.

Araya, J., M. I. Cano, H. B. Gomes, E. M. Novak, J. M. Requena, C. Alonso, M. J. Levin, P. Guevara, J. L. Ramirez and J. F. Da Silveira (1997). "Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*." Parasitology **115 (Pt 6)**: 563-570.

Avendaño, A., O. Calderón-Arguedas, I. Valerio and I. Chinchilla (2006). "Heterogeneidad en la metaciclógenesis in vitro de clones derivados de una cepa costarricense de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*)." Parasitología latinoamericana **61**: 12-16.

Aznar, C., P. Lopez-Bergami, S. Brandariz, C. Mariette, P. Liegeard, M. D. Alves, E. L. Barreiro, R. Carrasco, S. Lafon, D. Kaplan and et al. (1995). "Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection." FEMS Immunol Med Microbiol **12**(3-4): 231-238.

Barnabe, C., S. Brisse and M. Tibayrenc (2000). "Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach." Parasitology **120 (Pt 5)**: 513-526.

Bautista-Lopez, N. L., C. A. Morillo, P. Lopez-Jaramillo, R. Quiroz, C. Luengas, S. Y. Silva, J. Galipeau, M. M. Lalu and R. Schulz (2013). "Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic markers in the progression to Chagas cardiomyopathy." Am Heart J **165**(4): 558-566.

Bern, C. (2011). "Anti*Trypanosomal* therapy for chronic Chagas' disease." N Engl J Med **364**(26): 2527-2534.

Bern, C. and S. P. Montgomery (2009). "An estimate of the burden of Chagas disease in the United States." Clin Infect Dis **49**(5): e52-54.

Bern, C., S. P. Montgomery, L. Katz, S. Caglioti and S. L. Stramer (2008). "Chagas disease and the US blood supply." Curr Opin Infect Dis **21**(5): 476-482.

Berrizbeitia, M., M. Ndao, J. Bubis, M. Gottschalk, A. Ache, S. Lacouture, M. Medina and B. J. Ward (2006). "Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease." J Clin Microbiol **44**(2): 291-296.

Berrizbietia, M., M. Ndao, M. Gottschalk, A. Ache, F. Vasquez, S. Lacouture, M. Medina and B. J. Ward (2004). "Development and comparison of enzyme immunoassays

for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays." J Clin Microbiol **42**(4): 1766-1769.

Bhattacharyya, T., J. Brooks, M. Yeo, H. J. Carrasco, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn and M. A. Miles (2010). "Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology." Int J Parasitol **40**(8): 921-928.

Bogliolo, A. R. and D. G. Godfrey (1987). "Isoenzyme changes during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*." Trans R Soc Trop Med Hyg **81**(2): 222-229.

Bongertz, V. and J. A. Dvorak (1983). "*Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks." Am J Trop Med Hyg **32**(4): 716-722.

Bosseno, M.-F., C. Barnabé, E. Magallón Gastélum, F. Lozano Kasten, J. Ramsey, B. Espinoza and S. F. Brenière (2002). "Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico." Journal of Clinical Microbiology **40**(2): 627-632.

Bosseno, M. F., C. Barnabe, M. J. Sierra, P. Kengne, S. Guerrero, F. Lozano, K. Ezequiel, M. Gastelum and S. F. Breniere (2009). "Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico." Am J Trop Med Hyg **80**(6): 988-991.

Bosseno, M. F., B. Espinoza, B. Sanchez and S. F. Breniere (2000). "Mexican *Trypanosoma cruzi* stocks: analysis of minicircle kDNA homologies by cross-hybridization." Mem Inst Oswaldo Cruz **95**(4): 473-476.

Bottino, C. G., L. P. Gomes, J. B. Pereira, J. R. Coura, D. W. Provance, Jr. and S. G. De-Simone (2013). "Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay." BMC Infect Dis **13**: 568.

Botto-Mahan, C., G. Rojo, A. Sandoval-Rodriguez, F. Pena, S. Ortiz and A. Solari (2015). "Temporal variation in *Trypanosoma cruzi* lineages from the native rodent *Octodon degus* in semiarid Chile." Acta Trop **151**: 178-181.

Brener, Z. (1971). "Life cycle of *Trypanosoma cruzi*." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **13**(3): 171-178.

Brener, Z. (1973). "Biology of *Trypanosoma cruzi*." Annu Rev Microbiol **27**: 347-382.

Brener, Z. (1985). "General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **18**: 1-8.

Breniere, S. F., M. F. Bosseno, F. Noireau, N. Yacsik, P. Liegeard, C. Aznar and M. Hontebeyrie (2002). "Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(3): 289-295.

Breniere, S. F., N. Yaksic, J. Telleria, M. F. Bosseno, F. Noireau, P. Wincker and D. Sanchez (1997). "Immune response to *Trypanosoma cruzi* shed acute phase antigen in children from an endemic area for Chagas' disease in Bolivia." Mem Inst Oswaldo Cruz **92**(4): 503-507.

Briceno, L., E. M. Rodriguez, M. Medina, Y. Campos, W. Mosca, A. Briceno and G. Leon (2010). "An inexpensive antigen for serodiagnosis of Chagas' disease." Invest Clin **51**(1): 101-113.

Briones, M. R., R. P. Souto, B. S. Stolf and B. Zingales (1999). "The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity." Mol Biochem Parasitol **104**(2): 219-232.

Brisse, S., C. Barnabe and M. Tibayrenc (2000). "Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis." Int J Parasitol **30**(1): 35-44.

Brisse, S., J. Verhoef and M. Tibayrenc (2001). "Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages." Int J Parasitol **31**(11): 1218-1226.

Broutin, H., F. Tarrieu, M. Tibayrenc, B. Oury and C. Barnabe (2006). "Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **113**(1): 1-7.

Buchovsky, A. S., O. Campetella, G. Russomando, L. Franco, R. Oddone, N. Candia, A. Luquetti, S. M. Gonzalez Cappa and M. S. Leguizamon (2001). "trans-sialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas' disease." Clin Diagn Lab Immunol **8**(1): 187-189.

Burgos, J. M., S. Begher, H. M. Silva, M. Bisio, T. Duffy, M. J. Levin, A. M. Macedo and A. G. Schijman (2008). "Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS." Am J Trop Med Hyg **78**(2): 294-297.

Burns, J. M., Jr., W. G. Shreffler, D. E. Rosman, P. R. Sleath, C. J. March and S. G. Reed (1992). "Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1239-1243.

Camargo, E. P. (1964). "GROWTH AND DIFFERENTIATION IN *TRYPANOSOMA CRUZI*. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **6**: 93-100.

Camargos, E. R., D. J. Franco, C. M. Garcia, A. P. Dutra, A. L. Teixeira, Jr., E. Chiari, Concei and C. R. Machado (2000). "Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs." Am J Trop Med Hyg **62**(5): 604-612.

Campo, V. A., C. A. Buscaglia, J. M. Di Noia and A. C. C. Frasch (2006). "Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*." Microbes and Infection **8**(2): 401-409.

Camussone, C., V. Gonzalez, M. S. Belluzo, N. Pujato, M. E. Ribone, C. M. Lagier and I. S. Marcipar (2009). "Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis." Clin Vaccine Immunol **16**(6): 899-905.

Cancino-Faure, B., R. Fisa, C. Riera, I. Bula, E. Girona-Llobera and T. Jimenez-Marco (2015). "Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors." Transfusion **55**(6): 1249-1255.

Cano, M. I., A. Gruber, M. Vazquez, A. Cortes, M. J. Levin, A. Gonzalez, W. Degrave, E. Rondinelli, B. Zingales, J. L. Ramirez and et al. (1995). "Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project." Mol Biochem Parasitol **71**(2): 273-278.

Carabarin-Lima, A., M. C. Gonzalez-Vazquez, O. Rodriguez-Morales, L. Baylon-Pacheco, J. L. Rosales-Encina, P. A. Reyes-Lopez and M. Arce-Fonseca (2013). "Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update." Acta Trop **127**(2): 126-135.

Cardoso, J., M. J. Soares, R. F. Menna-Barreto, R. Le Bloas, V. Sotomaior, S. Goldenberg and M. A. Krieger (2008). "Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis." Parasitol Res **103**(4): 941-951.

Carmona, S. J., M. Nielsen, C. Schafer-Nielsen, J. Mucci, J. Altcheh, V. Balouz, V. Tekiel, A. C. Frasc, O. Campetella, C. A. Buscaglia and F. Agüero (2015). "Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants." Mol Cell Proteomics **14**(7): 1871-1884.

Carneiro, M., A. Romanha and C. E (1991). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes." Mem Inst Oswaldo Cruz **83**(4): 387-393.

Carneiro, M., A. J. Romanha and E. Chiari (1991). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(4): 387-393.

Castillo, C., R. Lopez-Munoz, J. Duaso, N. Galanti, F. Jana, J. Ferreira, G. Cabrera, J. D. Maya and U. Kemmerling (2012). "Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi." Placenta **33**(12): 991-997.

Castro, C., S. P. Craig and M. Castaneda (1981). "Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **4**(5-6): 273-282.

Cervantes-Landin, A. Y., I. Martinez-Martinez, P. A. Reyes, M. Shabib and B. Espinoza-Gutierrez (2014). "[Standardization of Dot-ELISA for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, compared to ELISA and Western blot]." Enferm Infecc Microbiol Clin **32**(6): 363-368.

Cervantes-Landin, A. Y., I. Martinez, M. Schabib and B. Espinoza (2014). "High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania* spp. in serological diagnosis tests." Biomed Res Int **2014**: 365403.

Cetron, M. S., R. Hoff, S. Kahn, H. Eisen and W. C. Van Voorhis (1992). "Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas' disease." Acta Trop **50**(3): 259-266.

Clark, C. G. and O. J. Pung (1994). "Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America." Mol Biochem Parasitol **66**(1): 175-179.

Contreras, V. T., J. M. Salles, N. Thomas, C. M. Morel and S. Goldenberg (1985). "In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions." Molecular and Biochemical Parasitology **16**(3): 315-327.

Cotrim, P. C., G. Paranhos-Baccala, M. R. Santos, C. Mortensen, M. I. Cano, M. Jolivet, E. M. Camargo, R. A. Mortara and J. F. Da Silveira (1995). "Organization and

expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*." Molecular and Biochemical Parasitology **71**(1): 89–98.

Coura, J. R. (2007). "Chagas disease: what is known and what is needed--a background article." Mem Inst Oswaldo Cruz **102 Suppl 1**: 113-122.

Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2010). "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review." Acta Trop **115**(1-2): 5-13.

Crane, M. S. and J. A. Dvorak (1979). "*Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells. DNA synthesis and growth of intracellular amastigotes and their relationship to host cell DNA synthesis and growth." J Protozool **26**(4): 599-604.

Cruz-Reyes, A. and J. M. Pickering-Lopez (2006). "Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(4): 345-354.

Cura, C. I., T. Duffy, R. H. Lucero, M. Bisio, J. Peneau, M. Jimenez-Coello, E. Calabuig, M. J. Gimenez, E. Valencia Ayala, S. A. Kjos, J. Santalla, S. M. Mahaney, N. M. Cayo, C. Nagel, L. Barcan, E. S. Malaga Machaca, K. Y. Acosta Viana, L. Brutus, S. B. Ocampo, C. Aznar, C. A. Cuba Cuba, R. E. Gurtler, J. M. Ramsey, I. Ribeiro, J. L. VandeBerg, Z. E. Yadon, A. Osuna and A. G. Schijman (2015). "Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples." PLoS Negl Trop Dis **9**(5): e0003765.

Cura, C. I., A. M. Mejia-Jaramillo, T. Duffy, J. M. Burgos, M. Rodriguez, M. V. Cardinal, S. Kjos, R. Gurgel-Goncalves, D. Blanchet, L. M. De Pablos, N. Tomasini, A. da Silva, G. Russomando, C. A. Cuba, C. Aznar, T. Abate, M. J. Levin, A. Osuna, R. E. Gurtler, P. Diosque, A. Solari, O. Triana-Chavez and A. G. Schijman (2010). "*Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes." Int J Parasitol **40**(14): 1599-1607.

Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **1**: 159-218.

Chapman, M. D., R. C. Baggaley, P. F. Godfrey-Fausset, T. J. Malpas, G. White, J. Canese and M. A. Miles (1984). "*Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya." J Protozool **31**(3): 482-486.

da Silveira, J. F., E. S. Umezawa and A. O. Luquetti (2001). "Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis." Trends Parasitol **17**(6): 286-291.

de Lana, M., A. da Silveira Pinto, C. Barnabe, V. Quesney, S. Noel and M. Tibayrenc (1998). "*Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*." Exp Parasitol **90**(1): 20-25.

De Marchi, C. R., J. M. Di Noia, A. C. Frasch, V. Amato Neto, I. C. Almeida and C. A. Buscaglia (2011). "Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease." Clin Vaccine Immunol **18**(11): 1850-1855.

del Puerto, R., J. E. Nishizawa, M. Kikuchi, N. Iihoshi, Y. Roca, C. Avilas, A. Gianella, J. Lora, F. U. Velarde, L. A. Renjel, S. Miura, H. Higo, N. Komiya, K. Maemura and K. Hirayama (2010). "Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia." PLoS Negl Trop Dis **4**(5): e687.

Deneris, J. and N. A. Marshall (1989). "Biological characterization of a strain of *Trypanosoma cruzi* chagas isolated from a human case of trypanosomiasis in California." Am J Trop Med Hyg **41**(4): 422-428.

Devera, R., O. Fernandes and J. R. Coura (2003). "Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(1): 1-12.

Di Noia, J. M., C. A. Buscaglia, C. R. De Marchi, I. C. Almeida and A. C. Frasch (2002). "A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage." J Exp Med **195**(4): 401-413.

Dias, F. B. S., L. Diotaiuti, A. J. Romanha, C. M. Bezerra and E. M. d. M. Machado (2007). "First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **102**: 643-645.

Dias, G. B., A. P. Gruending, S. M. Araujo, M. L. Gomes and M. J. Toledo (2013). "Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II." Exp Parasitol **135**(3): 511-517.

Dias, J. C. (1989). "The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review." Rev Soc Bras Med Trop **22**(3): 147-156.

Dietrich, P., P. Dussan Mdel, L. M. Floeter-Winter, M. H. Affonso, E. P. Camargo and M. B. Soares (1990). "Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*." Mol Biochem Parasitol **42**(1): 13-19.

Diez, C., S. Gea, I. Marcipar, S. M. Pezzotto, J. Beloscar, O. Pellizzon, A. Marcipar and O. Bottasso (2006). "Cardiovascular risk factors in chronic Chagas' disease are associated with a different profile of putative heart-pathogenic antibodies." FEMS Immunol Med Microbiol **48**(1): 26-33.

DosReis, G. A. (2011). "Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease." Braz J Med Biol Res **44**(2): 84-90.

Duaso, J., E. Yanez, C. Castillo, N. Galanti, G. Cabrera, G. Corral, J. D. Maya, I. Zulantay, W. Apt and U. Kemmerling (2012). "Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense?" J Trop Med **2012**: 758357.

Dvorak, J. A. (1977). Host parasite relationships at the cellular level in *Trypanosoma cruzi* infection. Scientific Publication. Washington, Panamerican Health Organization. **347**: 1-10.

Dvorak, J. A., T. E. Hall, M. S. Crane, J. C. Engel, J. P. McDaniel and R. Uriegas (1982). "*Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence." J Protozool **29**(3): 430-437.

El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart and B. Andersson (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.

Elias, M. C., N. Vargas, L. Tomazi, A. Pedroso, B. Zingales, S. Schenkman and M. R. Briones (2005). "Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types." Mol Biochem Parasitol **140**(2): 221-227.

Espinoza, B., T. Rico, S. Sosa, E. Oaxaca, A. Vizcaino-Castillo, M. L. Caballero and I. Martinez (2010). "Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model." J Biomed Biotechnol **2010**: 890672.

Fabbro, D. L., V. Olivera, M. L. Bizai, S. Denner, C. Diez, I. Marcipar, M. Streiger, E. Arias, M. del Barco, D. Mendicino and O. Bottasso (2011). "Humoral immune response against P2beta from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage." Am J Trop Med Hyg **84**(4): 575-580.

Figuerola-Lara, M. d. V. (2009). Desarrollo y aplicación de un ensayo ELISA utilizando las proteínas excretadas y secretadas de las formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Postgrado Biología aplicada, Universidad de Oriente.

Flavia Nardy, A., C. G. Freire-de-Lima and A. Morrot (2015). "Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*." J Immunol Res **2015**: 178947.

Florencio-Martinez, L., C. Marquez-Duenas, G. Ballesteros-Rodea, S. Martinez-Calvillo and R. Manning-Cela (2010). "Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **126**(3): 332-336.

Frasch, A. C. and M. B. Reyes (1990). "Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology." Parasitol Today **6**(4): 137-139.

Freitas, J. M., E. Lages-Silva, E. Crema, S. D. Pena and A. M. Macedo (2005). "Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues." Int J Parasitol **35**(4): 411-417.

Gadelha, A. A., A. F. Vercosa, V. M. Lorena, M. Nakazawa, A. B. Carvalho, W. V. Souza, A. G. Ferreira, E. D. Silva, M. A. Krieger, S. Goldenberg and Y. M. Gomes (2003). "Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test." Vox Sang **85**(3): 165-170.

Galván, S., J. Rubio, R. Sánchez, J. Ortega and M. Castañeda (1983). Phenetic variation in *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* isolates.

Galvão, C., R. Carcavallo, D. Da Silva Rocha and J. Jurberg (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera,

Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.
Zootaxa.

García García, J., F. Jiménez Ponce, M. d. R. Arnud Viñas, R. T. Ylián and L. P. Leticia (2011). Introducción a la metodología de la investigación en ciencias de la salud. : McGraw-Hill Interamericana; p. 67-76. México, Mc.Graw-Hill.

Gil, J., R. Cimino, I. Lopez Quiroga, S. Cajal, N. Acosta, M. Juarez, R. Zacca, V. Orellana, A. Krolewiecki, P. Diosque and J. Nasser (2011). "[Reactivity of GST-SAPA antigen of *Trypanosoma cruzi* against sera from patients with Chagas disease and leishmaniasis]." Medicina (B Aires) **71**(2): 113-119.

Gilber, S. R., S. M. Alban, L. Gobor, O. Bescrovaine Jde, M. I. Myiazaki and V. Thomaz-Soccol (2013). "Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection." Rev Soc Bras Med Trop **46**(3): 310-315.

Gomez-Hernandez, C., K. Rezende-Oliveira, G. A. Nascentes, L. R. Batista, H. B. Kappel, J. A. Martinez-Ibarra, F. Trujillo Contreras, E. Lages-Silva and L. E. Ramirez (2011). "Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model." Rev Soc Bras Med Trop **44**(6): 684-690.

Gonçalves, C. S., A. R. Ávila, W. de Souza, M. C. M. Motta and D. P. Cavalcanti (2018). "Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation." Parasites & Vectors **11**(1): 83.

Gourbière, S., P. Dorn, F. Tripet and E. Dumonteil (2011). "Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control." Heredity **108**(3): 190-202.

Grobben, K. (1905). Farn *Trypanosomatide*. Lehrbuch der Zoologie. K. Grobben. **1**: 222.

Gruber, A. and B. Zingales (1993). "*Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease." Exp Parasitol **76**(1): 1-12.

Gualdrón-López, M., N. Chevalier, P. Van Der Smissen, P. J. Courtoy, D. J. Rigden and P. A. M. Michels (2013). "Ubiquitination of the glycosomal matrix protein receptor PEX5 in *Trypanosoma brucei* by PEX4 displays novel features." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1833**(12): 3076-3092.

Guedes, P. M., V. M. Veloso, M. V. Caliari, C. M. Carneiro, S. M. Souza, M. de Lana, E. Chiari, M. T. Bahia and L. M. Galvao (2007). "*Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs." Mem Inst Oswaldo Cruz **102**(2): 141-147.

Guevara, P., M. Dias, A. Rojas, G. Crisante, M. T. Abreu-Blanco, E. Umezawa, M. Vazquez, M. Levin, N. Anez and J. L. Ramirez (2005). "Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*): its application to parasite-vector biology." J Med Entomol **42**(1): 48-56.

Gutierrez, F. R., P. M. Guedes, R. T. Gazzinelli and J. S. Silva (2009). "The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease." Parasite Immunol **31**(11): 673-685.

Guzmán-Marín, E., J. Zavala-Castro, K. Acosta-Viana and M. Rosado-Barrera (1999). "Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*." Rev Biomed **10**(3): 177-184.

Guzmán Bracho, C., L. García García, J. Floriani Verdugo, S. Guerrero Martínez, M. Torres Cosme, C. Ramírez Melgar and O. Velasco Castrejón (1998). "Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México." Revista Panamericana de Salud Publica **4**(2): 94-99.

H Carbonetto, C., E. Malchiodi, M. G Chiamonte, N. Zwirner and R. A Margni (1989). Use of formalinized epimastigotes for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies using immunoenzyme technics.

Henriksson, J., J. C. Dujardin, C. Barnabe, S. Brisse, G. Timperman, J. Venegas, U. Pettersson, M. Tibayrenc and A. Solari (2002). "Chromosomal size variation in

Trypanosoma cruzi is mainly progressive and is evolutionarily informative." Parasitology **124**(Pt 3): 277-286.

Hershko, A., H. Heller, S. Elias and A. Ciechanover (1983). "Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown." J Biol Chem **258**(13): 8206-8214.

Hoare, C. A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.

Hoft, D. F., K. S. Kim, K. Otsu, D. R. Moser, W. J. Yost, J. H. Blumin, J. E. Donelson and L. V. Kirchhoff (1989). "*Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens." Infect Immun **57**(7): 1959-1967.

Honigberg, B. M., W. Balamuth, E. C. Bovee, J. O. Corliss, M. Gojdics, R. P. Hall, R. R. Kudo, N. D. Levine, A. R. Loeblich, Jr., J. Weiser and D. H. Wenrich (1964). "A REVISED CLASSIFICATION OF THE PHYLUM PROTOZOA." J Protozool **11**: 7-20.

Hotez, P. J., M. Alvarado, M. G. Basanez, I. Bolliger, R. Bourne, M. Boussinesq, S. J. Brooker, A. S. Brown, G. Buckle, C. M. Budke, H. Carabin, L. E. Coffeng, E. M. Fevre, T. Furst, Y. A. Halasa, R. Jasrasaria, N. E. Johns, J. Keiser, C. H. King, R. Lozano, M. E. Murdoch, S. O'Hanlon, S. D. Pion, R. L. Pullan, K. D. Ramaiah, T. Roberts, D. S. Shepard, J. L. Smith, W. A. Stolk, E. A. Undurraga, J. Utzinger, M. Wang, C. J. Murray and M. Naghavi (2014). "The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2865.

Houghton, R. L., D. R. Benson, L. D. Reynolds, P. D. McNeill, P. R. Sleath, M. J. Lodes, Y. A. Skeiky, D. A. Leiby, R. Badaro and S. G. Reed (1999). "A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera." J Infect Dis **179**(5): 1226-1234.

Ibanez-Cervantes, G., A. Martinez-Ibarra, B. Noguera-Torres, E. Lopez-Orduna, A. L. Alonso, C. Perea, T. Maldonado, J. M. Hernandez and G. Leon-Avila (2013).

"Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico." Parasitol Int **62**(1): 36-43.

Ibanez, C. F., J. L. Affranchino, R. A. Macina, M. B. Reyes, S. Leguizamon, M. E. Camargo, L. Aslund, U. Pettersson and A. C. Frasch (1988). "Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs." Mol Biochem Parasitol **30**(1): 27-33.

lenne, S., A. Pedroso, E. F. R. Carmona, M. R. Briones and B. Zingales (2010). "Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern." Infect Genet Evol **10**(5): 601-606.

InDRE (2015). LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS POR LABORATORIO. DGE-InDRE-RNLSP. Ciudad de México, Colección Publicaciones Técnicas del InDRE. **1**.

Jensen, C. and G. A. Schaub (1991). "Development of Blastocrithidia triatoma (Trypanosomatidae) in *Triatoma infestans* after vitamin B-supplementation of the blood-diet of the bug." European Journal of Protistology **27**(1): 17-20.

Jimenez, V. (2014). "Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*." Res Microbiol **165**(3): 155-165.

Junqueira, A. C. V., E. Chiari and P. Whicker "Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **90**(2): 129-132.

Kawashita, S. Y., G. F. Sanson, O. Fernandes, B. Zingales and M. R. Briones (2001). "Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution." Mol Biol Evol **18**(12): 2250-2259.

Kerner, N., P. Liegeard, M. J. Levin and M. Hontebeyrie-Joskowicz (1991). "*Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton." Exp Parasitol **73**(4): 451-459.

Kierszenbaum, F., M. Fresno and M. B. Szein (2002). "The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 91-101.

Kirchhoff, L. V. (2011). Chapter 1 - Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Advances in Parasitology. L. M. Weiss, H. B. Tanowitz and L. V. Kirchhoff, Academic Press. **75**: 1-18.

Kooy, R. F., F. Ashall, M. Van der Ploeg and J. P. Overdulve (1989). "On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **36**(1): 73-76.

Krautz, G. M., J. D. Peterson, L. M. Godsel, A. U. Krettli and D. M. Engman (1998). "Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins." Am J Trop Med Hyg **58**(2): 137-143.

Kress, Y., H. Tanowitz, B. Bloom and M. Wittner (1977). "*Trypanosoma cruzi*: Infection of normal and activated mouse macrophages." Experimental Parasitology **41**(2): 385-396.

Lafaille, J. J., J. Linss, M. A. Krieger, T. Souto-Padron, W. de Souza and S. Goldenberg (1989). "Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes." Mol Biochem Parasitol **35**(2): 127-136.

Lages-Silva, E., L. E. Ramirez, A. L. Pedrosa, E. Crema, L. M. da Cunha Galvao, S. D. Pena, A. M. Macedo and E. Chiari (2006). "Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil." J Clin Microbiol **44**(6): 2167-2171.

Lanar, D. E., L. S. Levy and J. E. Manning (1981). "Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **3**(5): 327-341.

Laurent, J. P., C. Barnabe, V. Quesney, S. Noel and M. Tibayrenc (1997). "Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*." Parasitology **114** (Pt 3): 213-218.

Levin, M. J., E. Mesri, R. Benarous, G. Levitus, A. Schijman, P. Levy-Yeyati, P. A. Chiale, A. M. Ruiz, A. Kahn, M. B. Rosenbaum and et al. (1989). "Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease." Am J Trop Med Hyg **41**(5): 530-538.

Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. W. Gaunt, M. Yeo, H. J. Carrasco and M. A. Miles (2009). "Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids." Int J Parasitol **39**(12): 1305-1317.

Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. Yeo, N. Acosta, M. W. Gaunt and M. A. Miles (2011). "Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids." PLoS Negl Trop Dis **5**(10): e1363.

Lima-Costa, M. F., D. L. Matos and A. L. Ribeiro (2010). "Chagas disease predicts 10-year stroke mortality in community-dwelling elderly: the Bambui cohort study of aging." Stroke **41**(11): 2477-2482.

Longhi, S. A., S. B. Brandariz, S. O. Lafon, L. L. Niborski, A. O. Luquetti, A. G. Schijman, M. J. Levin and K. A. Gómez (2012). "Evaluation of In-House ELISA Using *Trypanosoma cruzi* Lysate and Recombinant Antigens for Diagnosis of Chagas Disease and Discrimination of Its Clinical Forms." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **87**(2): 267-271.

Lopez-Cancino, S. A., E. Tun-Ku, H. K. De la Cruz-Felix, C. N. Ibarra-Cerdena, A. Izeta-Alberdi, A. Pech-May, C. J. Mazariegos-Hidalgo, A. Valdez-Tah and J. M. Ramsey (2015). "Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula." Acta Trop **151**: 58-72.

Lopez-Olmos, V., N. Perez-Nasser, D. Pinero, E. Ortega, R. Hernandez and B. Espinoza (1998). "Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop **69**(3): 239-254.

Lukes, J., D. L. Guilbride, J. Votypka, A. Zikova, R. Benne and P. T. Englund (2002). "Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure." Eukaryot Cell **1**(4): 495-502.

Luquetti, A. O., M. A. Miles, A. Rassi, J. M. de Rezende, A. A. de Souza, M. M. Povia and I. Rodrigues (1986). "*Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(3): 462-470.

Macedo, A. M., C. R. Machado, R. P. Oliveira and S. D. Pena (2004). "*Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **99**: 1-12.

Machado, C. A. and F. J. Ayala (2001). "Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7396-7401.

Magalhaes, J. B., S. G. Andrade and I. Sherlock (1996). "*Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of tritomine (biological and biochemical patterns)." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **38**(1): 23-28.

Malchiodi, E. L., M. G. Chiamonte, N. J. Taranto, N. W. Zwirner and R. A. Margni (1994). "Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6)." Clin Exp Immunol **97**(3): 417-423.

Manning-Cela, R., A. Cortes, E. Gonzalez-Rey, W. C. Van Voorhis, J. Swindle and A. Gonzalez (2001). "LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **69**(6): 3916-3923.

Marcipar, I. S., C. Roodveldt, G. Corradi, M. L. Cabeza, M. E. Brito, L. M. Winter, A. J. Marcipar and A. M. Silber (2005). "Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection." J Clin Microbiol **43**(11): 5498-5503.

Marcon, G. E. B., P. D. Andrade, D. M. de Albuquerque, J. d. S. Wanderley, E. A. de Almeida, M. E. Guariento and S. C. I. B. Costa (2002). "Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **43**(1): 39-43.

Marinho, C. R., D. Z. Bucci, M. L. Dagli, K. R. Bastos, M. G. Grisotto, L. R. Sardinha, C. R. Baptista, C. P. Goncalves, M. R. Lima and J. M. Alvarez (2004). "Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease." Infect Immun **72**(4): 2350-2357.

Marino, A. P., A. A. Silva, R. T. Pinho and J. Lannes-Vieira (2003). "*Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules." Braz J Med Biol Res **36**(8): 1121-1133.

Martinez-Diaz, R. A., J. A. Escario, J. J. Nogal-Ruiz and A. Gomez-Barrio (2001). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(1): 53-59.

Martínez Cuevas, T. I. (2013). Caracterización biológica y molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca. Maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Martinez, I., B. Noguera, F. Martinez-Hernandez and B. Espinoza (2013). "Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole." Vector Borne Zoonotic Dis **13**(3): 181-187.

Martins, C., C. S. Baptista, S. lenne, G. C. Cerqueira, D. C. Bartholomeu and B. Zingales (2008). "Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **160**(1): 60-64.

Martins, L. P., R. E. Castanho, A. L. Therezo, A. R. Ribeiro, L. Lima, M. M. Teixeira, M. A. Speranca, V. L. Rodrigues and J. A. da Rosa (2014). "Biological and molecular characterization of a *Trypanosoma cruzi* isolate obtained from *Panstrongylus megistus* captured in Sao Paulo State, Brazil." Acta Parasitol **60**(1): 65-74.

Mazzoti, L. (1940). "Dos casos Humanos de la enfermedad de Chagas el estado de Oaxaca." Gac. Med. Mex. **70**: 417-420.

McDaniel, J. P. and J. A. Dvorak (1993). "Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants." Mol Biochem Parasitol **57**(2): 213-222.

Melo, R. C. and Z. Brener (1978). "Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains." J Parasitol **64**(3): 475-482.

Mendes, T. A. d. O., J. L. Reis Cunha, R. de Almeida Lourdes, G. F. Rodrigues Luiz, L. D. Lemos, A. R. R. dos Santos, A. C. J. da Câmara, L. M. d. C. Galvão, C. Bern, R. H. Gilman, R. T. Fujiwara, R. T. Gazzinelli and D. C. Bartholomeu (2013). "Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays." PLOS Neglected Tropical Diseases **7**(10): e2524.

Mendonca, M. B., N. S. Nehme, S. S. Santos, E. Cupolillo, N. Vargas, A. Junqueira, R. D. Naiff, T. V. Barrett, J. R. Coura, B. Zingales and O. Fernandes (2002). "Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron." Parasitology **124**(Pt 2): 177-184.

Miles, M. A., R. A. Cedillos, M. M. Pova, A. A. de Souza, A. Prata and V. Macedo (1981). "Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?" Lancet **1**(8234): 1338-1340.

Monje-Rumi, M. M., C. P. Brandan, P. G. Ragone, N. Tomasini, J. J. Lauthier, A. M. Alberti D'Amato, R. O. Cimino, V. Orellana, M. A. Basombrio and P. Diosque (2015). "*Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI." Infect Genet Evol **29**: 53-59.

Monteón, P., T. Sosa and P. Reyes (1989). "Serological tests for American trypanosomiasis. A comparative study." Rev Latinoamer. Microbiol. **31**: 35–38.

Monteón, V., S. Godínez, G. Cruz-Zetina, J. Balmes, R. López and Ó. Hernández (2009). "Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metaciclógenesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol." REVISTA BIOMÉDICA **20**(3): 9.

Morel, C., E. Chiari, E. P. Camargo, D. M. Mattei, A. J. Romanha and L. Simpson (1980). "Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6810-6814.

Nagarkatti, R., F. F. de Araujo, C. Gupta and A. Debrabant (2014). "Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice." PLOS Neglected Tropical Diseases **8**(1): e2650.

Naves, L. L., M. V. da Silva, E. F. Fajardo, R. B. da Silva, F. B. De Vito, V. Rodrigues, E. Lages-Silva, L. E. Ramirez and A. L. Pedrosa (2017). "DNA content analysis allows discrimination between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*." PLoS One **12**(12): e0189907.

Novaes, R. D., R. V. Goncalves and I. S. Caldas (2016). "Could cross-immunological reactivity to *Trypanosoma cruzi* antigens be considered a rational strategy for designing vaccines against cancer?" Int J Cancer **139**(9): 2142-2143.

Oelemann, W. M., M. D. Teixeira, G. C. Verissimo Da Costa, J. Borges-Pereira, J. A. De Castro, J. R. Coura and J. M. Peralta (1998). "Evaluation of three commercial

enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease." J Clin Microbiol **36**(9): 2423-2427.

Ohyama, K., N. T. Huy, H. Yoshimi, N. Kishikawa, J. E. Nishizawa, Y. Roca, R. J. Revollo Guzman, F. U. Velarde, N. Kuroda and K. Hirayama (2016). "Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease." Parasite Immunol **38**(10): 609-617.

Oladiran, A. and M. Belosevic (2012). "Immune evasion strategies of trypanosomes: a review." J Parasitol **98**(2): 284-292.

Oliveira, L. G., C. C. Kuehn, C. D. dos Santos, M. A. Miranda, C. M. da Costa, V. J. Mendonca and J. C. do Prado Junior (2013). "Protective actions of melatonin against heart damage during chronic Chagas disease." Acta Trop **128**(3): 652-658.

Oliveira, R. P., N. E. Broude, A. M. Macedo, C. R. Cantor, C. L. Smith and S. D. Pena (1998). "Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3776-3780.

OMS (2017). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), Organización Mundial de la Salud.

OPS (2002). Nuevas Estrategias del programa de control de la Enfermedad de Chagas. OPS/HCP/HCT/227/02. Montevideo, Organización Panamericana de la Salud: 29.

Pan, A. A. and D. McMahon-Pratt (1989). "Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein." J Immunol **143**(3): 1001-1008.

Partel, C. D. and C. L. Rossi (1998). "A Rapid, Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for the Immunodiagnosis of Chagas' Disease." Immunological Investigations **27**(1-2): 89-96.

Pedroso, A., E. Cupolillo and B. Zingales (2003). "Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation." Mol Biochem Parasitol **129**(1): 79-90.

Peralta, J. M., M. G. Teixeira, W. G. Shreffler, J. B. Pereira, J. M. Burns, Jr., P. R. Sleath and S. G. Reed (1994). "Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens." J Clin Microbiol **32**(4): 971-974.

Pérez-Fuentes, R., M. D. C. Sánchez-Guillén, C. González-Alvarez, V. Monteón, P. A. Reyes and J. L. Rosales-Encina (1998). "Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen." Am J Trop Med Hyg **58**(6): 715-720.

Perez-Molina, J. A. and I. Molina (2018). "Chagas disease." Lancet **391**(10115): 82-94.

Petana, W. B. (1972). "A revision of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* strains from British Honduras, and the importance of strain characteristics in experimental chemotherapy of Chagas's disease." Trans R Soc Trop Med Hyg **66**(3): 463-470.

Pinho, R. T., R. C. Pedrosa, P. Costa-Martins and L. R. Castello-Branco (1999). "Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas." Acta Trop **72**(1): 31-38.

Pinto, A. S., M. de Lana, B. Bastrenta, C. Barnabe, V. Quesney, S. Noel and M. Tibayrenc (1998). "Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*." Parasitol Res **84**(5): 348-353.

Platta, H. W., F. El Magraoui, B. E. Bäumer, D. Schlee, W. Girzalsky and R. Erdmann (2009). "Pex2 and Pex12 Function as Protein-Ubiquitin Ligases in Peroxisomal Protein Import." Molecular and Cellular Biology **29**(20): 5505-5516.

Postan, M., J. P. McDaniel and J. A. Dvorak (1987). "Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones." Trans R Soc Trop Med Hyg **81**(3): 415-419.

Ragone, P. G., C. Pérez Brandán, M. Monje Rumi, N. Tomasini, J. J. Lauthier, R. O. Cimino, A. Uncos, F. Ramos, A. M. Alberti D'Amato, M. A. Basombrío and P. Diosque (2015). "Experimental Evidence of Biological Interactions among Different Isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco Region." PLOS ONE **10**(3): e0119866.

Ramos-Ligonio, A., J. Torres-Montero, A. Lopez-Monteon and E. Dumonteil (2012). "Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico." Infect Genet Evol **12**(7): 1341-1343.

Ramos Jr, A., F. R. Martins-Melo, J. Barbosa and J. Heukelbach (2010). "[The Role of Operational Research and the Challenges for Integration of Care and Control of Chagas Disease in the Brazilian Unified Health System]." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **43**(II): 12-17.

Ramsey, J. M., M. Elizondo-Cano, G. Sanchez-Gonzalez, A. Pena-Nieves and A. Figueroa-Lara (2014). "Opportunity cost for early treatment of Chagas disease in Mexico." PLoS Negl Trop Dis **8**(4): e2776.

Ramsey, J. M., R. Ordonez, A. Cruz-Celis, A. L. Alvear, V. Chavez, R. Lopez, J. R. Pintor, F. Gama and S. Carrillo (2000). "Distribution of domestic triatominae and stratification of Chagas Disease transmission in Oaxaca, Mexico." Med Vet Entomol **14**(1): 19-30.

Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. Marcondes de Rezende (2012). "American trypanosomiasis (Chagas disease)." Infect Dis Clin North Am **26**(2): 275-291.

Ray, D. S. (1987). "Kinetoplast DNA minicircles: High-copy-number mitochondrial plasmids." Plasmid **17**(3): 177-190.

Requena-Mendez, A., E. Aldasoro, E. de Lazzari, E. Sicuri, M. Brown, D. A. Moore, J. Gascon and J. Munoz (2015). "Prevalence of Chagas disease in Latin-American

migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis." PLoS Negl Trop Dis **9**(2): e0003540.

Revollo, S., B. Oury, J. P. Laurent, C. Barnabe, V. Quesney, V. Carriere, S. Noel and M. Tibayrenc (1998). "*Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties." Exp Parasitol **89**(1): 30-39.

Ribeiro, A. L., M. P. Nunes, M. M. Teixeira and M. O. Rocha (2012). "Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy." Nat Rev Cardiol **9**(10): 576-589.

Rimoldi, A., R. Tome Alves, D. L. Ambrosio, M. Z. Fernandes, I. Martinez, R. F. De Araujo, R. M. Cicarelli and J. A. Da Rosa (2012). "Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, *Trypanosomatidae*) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat." Parasitology **139**(1): 37-44.

Riou, G. and E. Delain (1969). "ABNORMAL CIRCULAR DNA MOLECULES INDUCED BY ETHIDIUM BROMIDE IN THE KINETOPLAST OF *Trypanosoma cruzi*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **64**(2): 618-625.

Risso, M. G., G. B. Garbarino, E. Mocetti, O. Campetella, S. M. Gonzalez Cappa, C. A. Buscaglia and M. S. Leguizamon (2004). "Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages." J Infect Dis **189**(12): 2250-2259.

Risso, M. G., P. A. Sartor, J. M. Burgos, L. Briceno, E. M. Rodriguez, F. Guhl, O. T. Chavez, B. Espinoza, V. M. Monteon, G. Russomando, A. G. Schijman, O. A. Bottasso and M. S. Leguizamon (2011). "Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area." Am J Trop Med Hyg **84**(1): 78-84.

Rocha, M. O., A. L. Ribeiro and M. M. Teixeira (2003). "Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy." Front Biosci **8**: e44-54.

Roellig, D. M. and M. J. Yabsley (2010). "Infectivity, pathogenicity, and virulence of *Trypanosoma cruzi* Isolates from sylvatic animals and vectors, and domestic dogs from the United States in ICR strain mice and SD strain rats." Am J Trop Med Hyg **83**(3): 519-522.

Rojas, F., J. Koszela, J. Búa, B. Llorente, R. Burchmore, M. Auer, J. C. Mottram and M. T. Téllez-Iñón (2017). "The ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 is essential for cytokinesis in contrast to putative subunits of a SCF complex in *Trypanosoma brucei*." PLOS Neglected Tropical Diseases **11**(6): e0005626.

Rozas, M., S. De Doncker, X. Coronado, C. Barnabe, M. Tibyarenc, A. Solari and J. C. Dujardin (2008). "Evolutionary history of *Trypanosoma cruzi* according to antigen genes." Parasitology **135**(10): 1157-1164.

Ruiz-Sanchez, R., M. P. Leon, V. Matta, P. A. Reyes, R. Lopez, D. Jay and V. M. Monteon (2005). "*Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(3): 281-283.

Russomando, G., Z. Sanchez, G. Meza and Y. de Guillen (2010). "Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease." Expert Rev Mol Diagn **10**(6): 705-707.

Saez-Alquezar, A., E. C. Sabino, N. Salles, D. F. Chamone, F. Hulstaert, H. Pottel, E. Stoops and M. Zrein (2000). "Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas." J Clin Microbiol **38**(2): 851-854.

Salazar-Schettino, P., M. Bucio, M. Cabrera Bravo, G. Rojas, Y. Guevara Gomez, A. Ruiz Hernandez, L. Gonzalez, R. Antonio Marin y Lopez, S. Romero Estrella, X. Teran Toledo and L. Infante Ramirez (2006). Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México. **1**.

Salazar Schettino, P. M., J. Tay, M. I. Bucio, I. Haro, M. E. Anzures and S. Flores Ayala (1984). "Primer caso de megaesofago con serologia positiva a *Trypanosoma cruzi*." Salud pública de México **26**(5): 452-455.

Sanchez-Gonzalez, G., A. Figueroa-Lara, M. Elizondo-Cano, L. Wilson, B. Novelo-Garza, L. Valiente-Banuet and J. M. Ramsey (2016). "Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004528.

Sanchez-Guillen, M. d. C., A. Lopez-Colombo, G. Ordonez-Toquero, I. Gomez-Albino, J. Ramos-Jimenez, E. Torres-Rasgado, H. Salgado-Rosas, M. Romero-Diaz, P. Pulido-Perez and R. Perez-Fuentes (2006). "Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(7): 733-740.

Sanchez, B., V. Monteon, P. A. Reyes and B. Espinoza (2001). "Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens." Arch Med Res **32**(5): 382-388.

Santos, M. R., M. I. Cano, A. Schijman, H. Lorenzi, M. Vazquez, M. J. Levin, J. L. Ramirez, A. Brandao, W. M. Degraive and J. F. da Silveira (1997). "The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener." Mem Inst Oswaldo Cruz **92**(6): 821-828.

Santos, S. S., E. Cupolillo, A. Junqueira, J. R. Coura, A. Jansen, N. R. Sturm, D. A. Campbell and O. Fernandes (2002). "The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene." Ann Trop Med Parasitol **96**(8): 755-764.

Saravia, N., A. Holguín, R. Cibulskis and A. D'Alessandro (1987). "Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia." Am J Trop Med Hyg 1987 **36**: 59-69.

Schijman, A. G., M. Bisio, L. Orellana, M. Sued, T. Duffy, A. M. Mejia Jaramillo, C. Cura, F. Auter, V. Veron, Y. Qvarnstrom, S. Deborggraeve, G. Hajar, I. Zulantay, R. H. Lucero, E. Velazquez, T. Tellez, Z. Sanchez Leon, L. Galvao, D. Nolder, M. Monje Rumi, J. E. Levi, J. D. Ramirez, P. Zorrilla, M. Flores, M. I. Jercic, G. Crisante, N. Anez, A. M. De Castro, C. I. Gonzalez, K. Acosta Viana, P. Yachelini, F. Torrico, C. Robello, P. Diosque, O. Triana Chavez, C. Aznar, G. Russomando, P. Buscher, A. Assal, F. Guhl, S. Sosa Estani, A. DaSilva, C. Britto, A. Luquetti and J. Ladzins (2011). "International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients." PLoS Negl Trop Dis **5**(1): e931.

Schmunis, G. A. and J. R. Cruz (2005). "Safety of the blood supply in Latin America." Clin Microbiol Rev **18**(1): 12-29.

Schmunis, G. A. and Z. E. Yadon (2010). "Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem." Acta Trop **115**(1-2): 14-21.

Social, E. M. d. S. y. P. (2009). Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España, Ministerio de Sanidad y Política Social, Centro de Publicaciones.

Solana, M. E., A. M. Katzin, E. S. Umezawa and C. S. Miatello (1995). "High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' disease." Journal of Clinical Microbiology **33**(6): 1456-1460.

Souto, R. P., O. Fernandes, A. M. Macedo, D. A. Campbell and B. Zingales (1996). "DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **83**(2): 141-152.

Souto, R. P. and B. Zingales (1993). "Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence." Mol Biochem Parasitol **62**(1): 45-52.

Souza, R. T., F. M. Lima, R. M. Barros, D. R. Cortez, M. F. Santos, E. M. Cordero, J. C. Ruiz, S. Goldenberg, M. M. Teixeira and J. F. da Silveira (2011). "Genome size,

karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*." PLoS One **6**(8): e23042.

Souza, W. (2009). "Structural organization of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 89-100.

Spickler, A. R. (2010). "Enfermedad de Chagas." 2010. 2017, from <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=chagas&lang=es>.

Spitzner, F. L., J. M. de Freitas, A. M. Macedo, M. J. de Ornelas Toledo, S. M. de Araújo, A. J. Prioli and M. L. Gomes (2007). "*Trypanosoma cruzi*-triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná state, Brazil." Acta Parasitologica **52**(1): 74-81.

Steindel, M. (1993). Caracterização de Cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* Isoladas de Reservatórios e Vetores Silvestres em Santa Catarina. PhD, Universidade Federal de Minas Gerais.

Sturm, N. R., N. S. Vargas, S. J. Westenberger, B. Zingales and D. A. Campbell (2003). "Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **33**(3): 269-279.

Tay, J., P. M. Salazar Schettino, M. Velasco Cedano, I. De Haro Arteaga, Y. Garcia Yanez and M. Gutierrez Quiroz (1979). "[Epidemiology of Chagas' disease in State of Jalisco, Republic of Mexico]." Salud Publica Mex **21**(2): 145-149.

Teixeira, M. G., J. Borges-Pereira, E. Netizert, M. L. Souza and J. M. Peralta (1994). "Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease." Trop Med Parasitol **45**(4): 308-312.

Thompson, C. T. and J. A. Dvorak (1989). "Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry." Anal Biochem **177**(2): 353-357.

Tibayrenc, M. (2010). American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research, Elsevier.

Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1988). "ISOZYME VARIABILITY IN *TRYPANOSOMA CRUZI*, THE AGENT OF CHAGAS' DISEASE: GENETICAL, TAXONOMICAL, AND EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE." Evolution **42**(2): 277-292.

Tibayrenc, M., K. Neubauer, C. Barnabé, F. Guerrini, D. Skarecky and F. J. Ayala (1993). "Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(4): 1335-1339.

Tomazi, L., S. Y. Kawashita, P. M. Pereira, B. Zingales and M. R. Briones (2009). "Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic." Genet Mol Res **8**(2): 458-476.

Torrico M., R. A. (1950). Epidemiology of Chagas disease in Bolivia. a. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP);29(8), OPS: 827-840.

Umezawa, E. S., S. F. Bastos, M. E. Camargo, L. M. Yamauchi, M. R. Santos, A. Gonzalez, B. Zingales, M. J. Levin, O. Sousa, R. Rangel-Aldao and J. F. da Silveira (1999). "Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America." J Clin Microbiol **37**(5): 1554-1560.

Umezawa, E. S., M. S. Nascimento, N. Kesper, Jr., J. R. Coura, J. Borges-Pereira, A. C. Junqueira and M. E. Camargo (1996). "Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease." J Clin Microbiol **34**(9): 2143-2147.

Umezawa, E. S., M. S. Nascimento and A. M. S. Stolf (2001). "Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **39**(3): 169-176.

Umezawa, E. S., A. I. Souza, V. Pinedo-Cancino, M. Marcondes, A. Marcili, L. M. Camargo, A. A. Camacho, A. M. Stolf and M. M. Teixeira (2009). "TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*." Acta Trop **111**(1): 15-20.

Valadares, H. M., J. R. Pimenta, M. Segatto, V. M. Veloso, M. L. Gomes, E. Chiari, K. J. Gollob, M. T. Bahia, M. de Lana, G. R. Franco, C. R. Machado, S. D. Pena and A. M. Macedo (2012). "Unequivocal identification of subpopulations in putative multiclonal *Trypanosoma cruzi* strains by FACs single cell sorting and genotyping." PLoS Negl Trop Dis **6**(7): e1722.

Valente, S. A., V. da Costa Valente, A. Y. das Neves Pinto, M. de Jesus Barbosa Cesar, M. P. dos Santos, C. O. Miranda, P. Cuervo and O. Fernandes (2009). "Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(3): 291-297.

Vargas, N., A. Pedroso and B. Zingales (2004). "Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups." Mol Biochem Parasitol **138**(1): 131-141.

Velasco-Castrejon, O., J. L. Valdespino, R. Tapia-Conyer, B. Salvatierra, C. Guzman-Bracho, C. Magos, A. Llausas, G. Gutierrez and J. Sepulveda (1992). "Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México." 1992 **34**(2): 11.

Velasco, O. and B. Rivas (2008). "Notes for the history of Chagas' disease in Mexico." Bol Med Hosp Infant Mex **65**(1): 57-79.

Verissimo da Costa, G. C., L. M. Lery, M. L. da Silva, H. Moura, R. H. Peralta, W. M. von Kruger, P. M. Bisch, J. R. Barr and J. M. Peralta (2013). "The identification and characterization of epitopes in the 30-34 kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients." J Proteomics **80**: 34-42.

Vickerman, K. (1976). The diversity of the kinetoplastid flagellates. Biology of the kinetoplastida. L. W. H. R. a. E. D. A. United Kingdom, Academic Press Inc. **1**: 1-34.

Vidal-Acosta, V., S. Ibáñez-Bernal and C. Martínez-Campos (2000). "Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en Mexico." 2000 **42**(6): 8.

Viotti, R., C. Vigliano, B. Lococo, M. Petti, G. Bertocchi, M. G. Alvarez and A. Armenti (2005). "[Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression]." Rev Esp Cardiol **58**(9): 1037-1044.

Weatherly, D. B., C. Boehlke and R. L. Tarleton (2009). "Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome." BMC Genomics **10**: 255.

Wendel, S., Z. Brener, E. M. Camargo and A. Rassi (1992). Chagas disease (american trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. S. B. d. H. e. Hematoterapia: 271.

Westenberger, S. J., C. Barnabe, D. A. Campbell and N. R. Sturm (2005). "Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*." Genetics **171**(2): 527-543.

WHO (2002). Control of Chagas Disease. W. T. R. Series. Geneva, WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease.

WHO (2007). Consultation on International Biological Reference - Preparations for Chagas Diagnostic Tests. W. H. Organization. Geneva.

WHO. (2010). "Anti-*Trypanosoma cruzi* ASSAYS: Operational Characteristics." Retrieved 2010, 2010.

Yao, B., D. Zheng, S. Liang and C. Zhang (2013). "Conformational B-Cell Epitope Prediction on Antigen Protein Structures: A Review of Current Algorithms and Comparison with Common Binding Site Prediction Methods." PLOS ONE **8**(4): e62249.

Yeo, M., I. L. Mauricio, L. A. Messenger, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, N. Acosta, T. Bhattacharyya, P. Diosque, H. J. Carrasco and M. A. Miles (2011). "Multilocus sequence

typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1049.

Zárate, L. G. and R. J. Zárate (1985). "A checklist of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico." International Journal Entomology **27**(1-2): 102-127.

Zavala-Castro, J. E., O. Velasco-Castrejon and R. Hernandez (1992). "Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA." Am J Trop Med Hyg **47**(2): 201-209.

Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc and A. G. Schijman (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(7): 1051-1054.

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

APENDICE I. Datos generales de los sueros reactivos y no reactivos

Tabla 20. Sueros reactivos utilizados en este trabajo (Parte 1). Datos generales de los sueros donados como reactivos a *T. cruzi*.

Muestra	Donado por	Origen		SEXO
		País	Estado	
R1	CETS	México	Oaxaca	H
R2	CETS	México	Oaxaca	H
R3	CETS	México	Oaxaca	M
R4	CETS	México	Oaxaca	H
R5	CETS	México	Oaxaca	H
R6	CETS	México	Oaxaca	M
R7	CETS	México	Oaxaca	M
R8	CETS	México	Oaxaca	M
R9	CETS	México	Oaxaca	Sin Datos
R10	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R11	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R12	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R13	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R14	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R15	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R16	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R17	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R18	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R19	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R20	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R21	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R22	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
R23	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
R24	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	Din datos
R25	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R26	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R27	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R28	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R29	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R30	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R31	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R32	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M

Tabla 21. Sueros reactivos utilizados en este trabajo (Parte 2). Datos generales de los sueros donados como reactivos a *T. cruzi*.

Muestra	Donado por	Origen		SEXO
		País	Estado	
R33	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R34	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R35	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R36	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R37	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R38	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R39	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R40	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R41	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R42	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R43	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R44	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R45	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R46	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R47	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R48	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R49	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R50	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R51	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R52	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R53	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R54	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R55	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R56	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
R57	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R58	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
R59	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	Sin Datos

Tabla 22. Sueros no reactivos utilizados en este trabajo (Parte 1). Datos generales de los sueros donados como no reactivos a *T. cruzi*.

Muestra	Donado por	Origen		SEXO
		País	Estado	
NR1	CETS	México	Oaxaca	H
NR2	CETS	México	Oaxaca	Sin Datos
NR3	CETS	México	Oaxaca	Sin Datos
NR4	CETS	México	Oaxaca	Sin Datos
NR5	CETS	Nigeria		M
NR6	CETS	México	Oaxaca	M
NR7	CETS	México	Oaxaca	H
NR8	CETS	México	Oaxaca	M
NR9	CETS	México	Oaxaca	M
NR10	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR11	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR12	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR13	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR14	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
NR15	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR16	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
NR17	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR18	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR19	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR20	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
NR21	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR22	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	H
NR23	Banco serológico CETS	México	Oaxaca	M
NR24	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR25	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR26	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR27	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M

Tabla 23. Sueros no reactivos utilizados en este trabajo (Parte 2). Datos generales de los sueros donados como no reactivos a *T. cruzi*.

MUESTRA	DONADO POR	ORIGEN		SEXO
		Pais	Estado	
NR28	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR29	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR30	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR31	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR32	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR33	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR34	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR35	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR36	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR37	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR38	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR39	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR40	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR41	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR42	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR43	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR44	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR45	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR46	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR47	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR48	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR49	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR50	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR51	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H
NR52	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR53	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	M
NR54	L13, FCQ, UABJO	México	Oaxaca	H

APENDICE II. Caracterización de los sueros, reactivos y no reactivos

ELISA Comercial

Una de las primeras pruebas que evaluamos fue la aplicación del ensayo de ELISA con un kit comercial. Dado que en el momento de realizar la caracterización de los sueros con esta técnica sólo contábamos con 9 muestras reactivas y 5 no reactivas, éstas fueron las únicas muestras evaluadas mediante esta técnica. Utilizamos el kit comercial Test ELISA CHAGAS III (GrupoBios-BiosChile® 1300442), que consta de placas de 96 pozos sensibilizadas con una mezcla de antígenos provenientes de extractos totales de las cepas Tulahuén y Mn (ambas TcV), y antígenos de membrana altamente inmunogénicos (Datos no disponibles). Se utilizó esta técnica porque es la empleada por algunos centros de referencia a nivel nacional (comunicación personal), además de que en un estudio realizado en 2010 por la OMS mostró ser una sensibilidad del 99.40% y una especificidad del 99.61%, siendo uno de los ensayos más sensible y específico de los valorados en ese estudio (WHO 2010).

Los sueros fueron utilizados a una dilución 1:11 como indica el fabricante, se utilizaron los controles positivo y negativo incluidos en el kit, arrojando los resultados que se muestran en la **Figura 26**. De las 9 muestras positivas, 8 dieron el mismo resultado, una de ellas fue clasificada como negativa al tener bajos niveles de densidad óptica (DO). En las muestras que fueron otorgadas como negativas, observamos que 4 de ellas fueron negativas a *T. cruzi*, mientras que 1 de ellas dio valores para presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* igual que las muestras reactivas. En la **Figura 26A** podemos observar que los datos muestran una dispersión amplia para reactividad positiva, mientras que los datos negativos se mantienen en un rango pequeño y con valores muy similares entre ellos. En la tabla presente en la **Figura 26B** se resumen los resultados obtenidos para este ensayo.

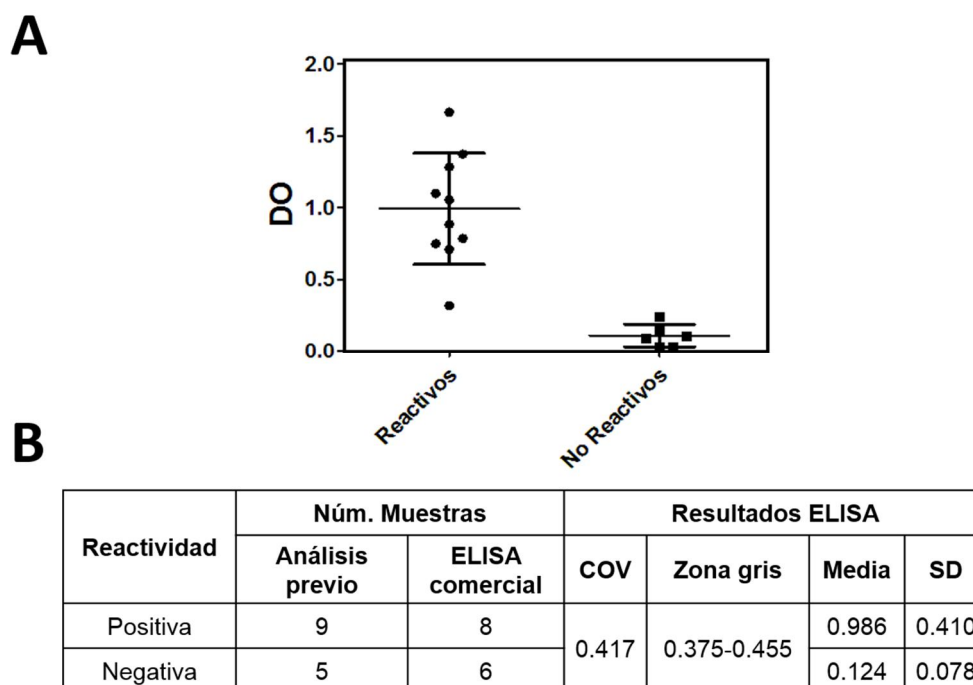


Figura 27. Ensayo de ELISA comercial Chagastest ELISA CHAGAS III (GrupoBios-BiosChile®). Un grupo de muestras se analizó mediante una prueba comercial para evaluar su reactividad a antígenos de *T. cruzi*. **A)** Se muestra la dispersión de los datos, así como la desviación estándar. **B)** Valores de corte, y resultados totales de reactividad de los sueros. Cada prueba fue realizada dos veces por triplicado.

Validación mediante ensayos de referencia epidemiológicos a nivel nacional

Analizamos un pequeño grupo de muestras con las pruebas estándar utilizadas por el InDRE (5 reactivas y 5 no reactivas), que es la entidad epidemiológica en el país encargada de validar los sueros para identificar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sueros humanos. Estas pruebas consisten en un ELISA casero con extracto total de epimastigotes de una mezcla de 21 cepas del parásito de originarias de distintos estados de la República Mexicana. La segunda prueba fue un ensayo de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), en el que el antígeno consiste en epimastigotes fijados, provenientes de una mezcla de tres cepas distintas.

Para el ensayo de ELISA los sueros fueron utilizados a una dilución de 1:50, se utilizaron 4 sueros control: un suero con alta reactividad, uno con reactividad media, un suero con

reactividad baja, y uno negativo a 21 pruebas serológicas a las que fueron sometidos para validarlas como panel de referencia. El punto de corte (Cov) fue determinado previamente por el grupo de trabajo, utilizando la prueba ROC. Por lo que este fue establecido en 0.315. Los resultados indicaron que sólo dos de las 5 muestras reactivas dieron positivo, 3 de ellas fueron negativas, y de los sueros no reactivos todos fueron concordantes con el resultado esperado (**Figura 27**).

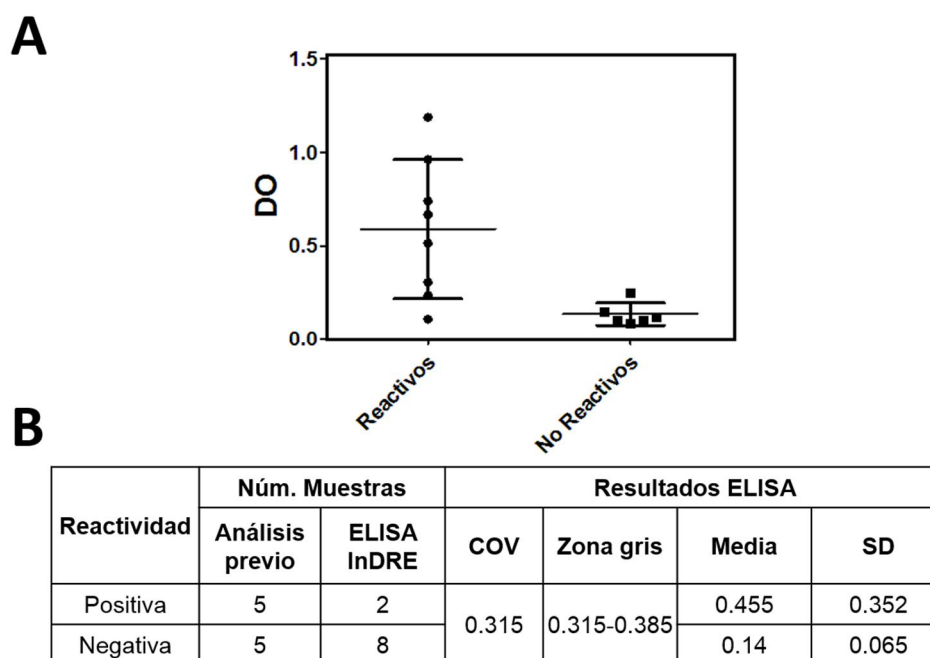


Figura 28. ELISA con extracto total de epimastigotes de distintas cepas mexicanas utilizada en el InDRE. Se realizó un análisis de las muestras utilizando la técnica de ELISA, que consiste en extracto total de proteínas de epimastigotes de veinte cepas de distintos Estados de la República Mexicana, uso de la técnica aplicada en el InDRE. **A)** Diagrama de dispersión, donde se muestra la media de cada valor, que obtuvo cada muestra analizada por cuadruplicado, y la desviación estándar. **B)** Tabla general con los resultados obtenidos en el ensayo, valor de corte (COV), media y desviación estándar (SD).

Las muestras serológicas se analizaron a seis diluciones distintas 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024, usando dos controles positivos, uno con alta reactividad y uno con baja reactividad, además de usar un control negativo. Los resultados en este tipo de pruebas se analizan de manera cualitativa ya que depende del observador para

identificar a una muestra como positiva o negativa, ya que se utilizan parásitos fijados, y la medición de la prueba se hace mediante microscopía de epifluorescencia. Se toman como positivas aquellas muestras en donde se observen más del 50% reactivas de parásitos en color verde, y como negativas aquellas donde más del 50% de los parásitos se vean rojos, se leyeron 5 campos al azar.

Los resultados indican que 4 de los 5 sueros reactivos (R) dieron positivo mediante esta técnica, la muestra R4 mostró una alta concentración de anticuerpos anti-*T. cruzi* ya que se pudo detectar más del 50% de fluorescencia de los parásitos hasta una la dilución 1:256. La muestra R5 dio negativo a esta prueba, y las muestras NR1, NR3, NR4 y NR5 dieron positivo a *T. cruzi*, sólo una de las muestras negativas no reaccionó con los parásitos (**Tabla 17**).

Tabla 24. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizada en el InDRE. Los ensayos IFI fueron realizados con epimastigotes fijados de una mezcla de aislados obtenidos por el InDRE.

MUESTRA	RESULTADO	DILUCIÓN
R1	Positivo	1:32
R2	Positivo	1:32
R3	Positivo	1:32
R4	Positivo	1:256
R5	Negativo	0
NR1	Positivo	1:32
NR2	Negativo	0
NR3	Positivo	1:32
NR4	Positivo	1:32
NR5	Positivo	1:32
Ctrl Positivo +++	Positivo	1:128
Ctrl Positivo +	Positivo	1:32
CtrlNegativo	Negativo	0

R= muestras reactivas. NR= muestras No Reactivas. Ctrl = control.

Como podemos observar en los resultados obtenidos por estas pruebas la discordancia entre pruebas varía mucho, ya que ensayos realizados en un mismo laboratorio, y con

antígenos similares modifica el resultado obtenido. Motivo por el cual las recomendaciones de la OMS son utilizar al menos dos pruebas y que en ambas tengas resultados similares. En el caso de la muestra 5, que dio positiva a las pruebas serológicas utilizadas en el CETS y dio resultados negativos a ambas pruebas utilizadas cotidianamente por el InDRE (ver resultados de ELISA en **Apéndice 2**), podría indicar, por un lado, que se trata de una muestra negativa, o que se trata de un suero con anticuerpos que provocan reacción cruzada.

ELISA casero

Una de las técnicas que se aplica en los laboratorios de diagnóstico a nivel nacional es la prueba de ELISA casero, se denomina así porque se utilizan antígenos provenientes de cepas mantenidas en el laboratorio y procesadas por el mismo equipo de trabajo. Para este ensayo se utilizaron extractos totales de epimastigotes y de tripomastigotes derivados de infecciones en cultivo celular.

Por tanto, en el laboratorio se establecieron las condiciones para implementar esta técnica y confirmar el título de anticuerpos IgG de humano anti-*T. cruzi* presentes en los sueros donados y utilizados para la realización de este trabajo. Se utilizaron dos cepas del parásito como antígenos de referencia, la cepa Querétaro como referencia a ensayos de inmunoensayo ELISA realizados a nivel Nacional, y la cepa Y como cepa de referencia para pruebas realizadas a nivel Latinoamérica e internacional puesto que muchas de las pruebas comerciales utilizan antígenos provenientes de esa cepa (Almeida, Covas et al. 1997, Oelemann, Teixeira et al. 1998, Pinho, Pedrosa et al. 1999, Sanchez, Monteon et al. 2001, WHO 2010, Cervantes-Landin, Martinez-Martinez et al. 2014, Cervantes-Landin, Martinez et al. 2014).

En cuanto a los resultados obtenidos usando extractos totales de epimastigotes de ambas cepas de referencia, podemos observar que los datos de los sueros reactivos muestran mayor dispersión que los sueros no reactivos. Se utilizaron tres diluciones distintas 1:50, 1:100 y 1:200 para identificar aquella dilución en la que se representaran

mejor los datos, además de ver el límite detectado por los anticuerpos de las muestras (Figura 28).

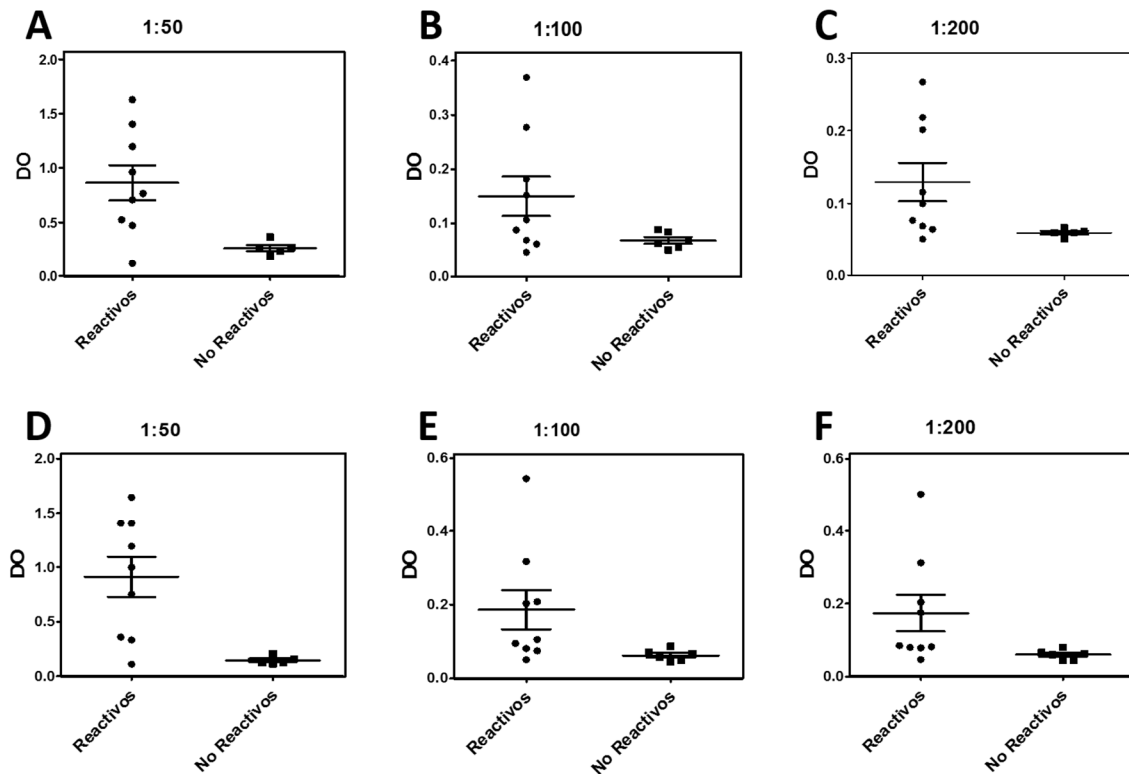


Figura 29. ELISA casero con extractos totales de epimastigotes de la cepa Querétaro y de la cepa Y. Diagramas de dispersión de los ensayos de ELISA con extracto total de epimastigotes de las cepas Querétaro y Y. Para estandarizar las condiciones de la prueba, se utilizaron tres diluciones distintas de los sueros para cada caso. **A)** Dilución 1:50 de los sueros evaluados con extracto total de epimastigotes Querétaro. **B)** Dilución 1:100 de los sueros evaluados con el extracto total de epimastigotes Querétaro. **C)** Dilución 1:200 de los sueros evaluados con el extracto total de epimastigotes. **D)** Dilución 1:50 de los sueros evaluados con extracto total de epimastigotes de la cepa Y. **E)** Dilución 1:100 de los sueros evaluados con extracto total de epimastigotes de la cepa Y. **F)** Dilución 1:200 de los sueros evaluados con extracto total de epimastigote de la cepa Y. En cada gráfico de dispersión se muestra la media de tres evaluaciones, y la desviación estándar.

Para reporte y análisis de datos se tomaron en cuenta los resultados obtenidos en la dilución 1:50 dado que con en esta concentración se observaron los mejores resultados,

aunado al hecho de que en los laboratorios de diagnóstico está es la dilución con la que se trabaja comúnmente. El punto de corte (COV) se estableció como se menciona en materiales y métodos, tomando en consideración la media más 2.5 desviaciones estándar (SD) (**Tabla 9**). Tanto con los extractos de la cepa Querétaro como con la cepa Y, se obtuvieron como positivos sólo 8 de los 9 sueros reactivos (88.88%), mientras que, para los sueros con reactividad negativa obtuvimos el mismo resultado previo en el 100% de los casos (6/6). Finalmente, una muestra reactiva, mostró no ser reactiva a *T. cruzi* mediante este ensayo, esto podría ser un reflejo de lo reportado en la literatura, donde se menciona la existencia de muestras con resultados discordantes entre las técnicas empleadas.

Tabla 25. Resultados obtenidos en un ensayo de ELISA con extracto total de epimastigotes de la cepa Querétaro y cepa Y.

CEPA	REACTIVIDAD	NÚM. MUESTRAS		RESULTADOS ELISA			
		Análisis previo	ELISA casero	COV	Zona gris	Media	SD
Querétaro	Positiva	9	8	0.422	0.380- 0.464	0.96	0.419
	Negativa	6	7			0.26	0.065
Y	Positiva	9	8	0.241	0.217- 0.265	1.01	0.492
	Negativa	6	7			0.15	0.038

Se realizaron ensayos de ELISA con extractos de tripomastigotes derivados de cultivo celular de la cepa Querétaro, utilizando las mismas diluciones que en el ensayo anterior (1:50, 1:100, 1:200). Donde se observaron resultados similares a los anteriores, una distribución más amplia en los sueros con reactividad positiva y 29 una distribución más concentrada entre muestras negativas (**Figura 29**).

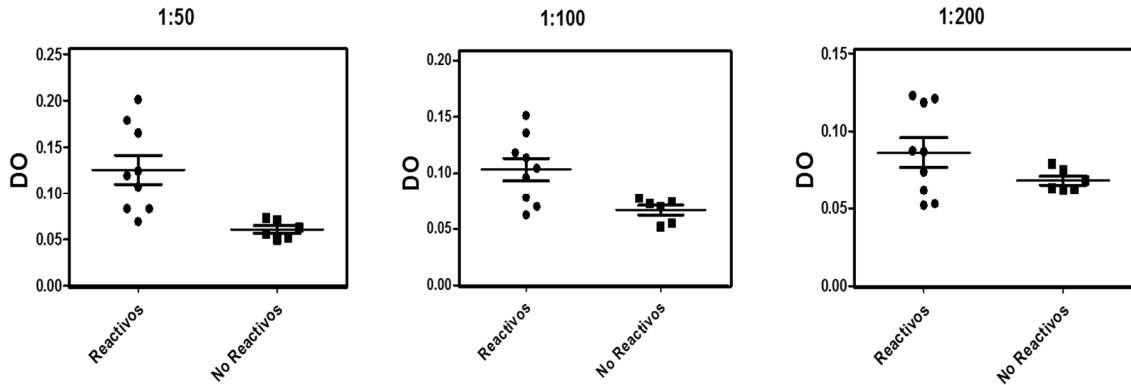


Figura 30. ELISA casero con extractos totales de tripomastigotes de la cepa Querétaro. Se realizaron ensayos de ELISA de extractos totales de tripomastigotes de la cepa Querétaro como antígeno. Se emplearon tres diluciones distintas (1:50, 1:100 y 1:200), para detectar el nivel más bajo de reactividad de los sueros. Se muestran los gráficos de dispersión con la media de cada muestra evaluada por triplicado, así como la desviación estándar.

Al realizar un análisis de las muestras en la dilución 1:50, encontramos una concordancia de los datos del 73% con los resultados obtenidos previamente en el diagnóstico de las muestras. De las 9 muestras positivas obtuvimos el 55.55% de concordancia (5/9), menor al observado en la prueba anterior, sugiriendo la posibilidad de que en el uso de proteínas de totales de epimastigotes incrementará la existencia de fasos negativos puesto que ya se ha observado que algunas proteínas sintetizadas por este estadio del parásito producen reactividad cruzada (**Tabla 19**). El 80% de las muestras negativa (5/6) arrojaron un resultado similar al visto tanto en por el análisis previo (diagnóstico) como por el ensayo anterior (ELISA con proteínas de epimastigotes). No obstante, se obtuvieron 2 pruebas que cayeron en la zona gris o zona indeterminada, evento que ocurre comúnmente en los análisis de muestras sanguíneas. El número de pruebas discordantes incremento ya que, de sólo tener una muestra positiva con un resultado negativo, en este caso se obtuvieron 3 de ellas lo que representa el 20.0% del total de muestras.

Tabla 26. Resultados obtenidos en ELISA con extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro.

Cepa	Reactividad	Núm. Muestras		Resultados ELISA			
		Análisis previo	ELISA casero	COV	Zona gris	Media	SD
Querétaro	Positiva	9	5	0.064	0.057 - 0.07	0.082	0.042
	Negativa	6	8			0.055	0.004
	Indeterminada	0	2			Nd	Nd

Dado que las muestras analizadas hasta este momento eran pocas, y de acuerdo con los resultados obtenidos, decidimos realizar un ensayo de ELISA de todas las muestras recabadas (112), utilizando como antígeno extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro ya que al tratarse del estadio presente en el hospedero mamífero este podría arrojar mejores resultados de especificidad. En este caso se utilizó únicamente la dilución 1:50, ya que los resultados previos nos indicaron que es una dilución lo suficientemente óptima para identificar las muestras positivas y negativas.

Como era de esperar, se observó una dispersión más amplia en las muestras positivas que en la no reactivas (**Figura 30A**). Al analizar los datos con el valor de corte calculado, los resultados indican que no todas las muestras dieron el resultado previsto, pues 45 de las 59 muestras reactivas dieron un resultado positivo, 12 se quedaron en la zona indeterminada, es decir, no sabemos si se tratan de muestras positivas o negativas, por lo que, con lo establecido en el reglamento de la OMS para diagnóstico de ECh deberían hacerse al menos dos pruebas extras para estas muestras, y finalmente dos muestras dieron valores francamente negativos. Se obtuvo una concordancia baja entre los resultados negativos del 32.08% (17/53), ya que la mayoría de las muestras permanecieron en la zona indeterminada (28/53), y 9 muestras negativas arrojaron resultados positivos.

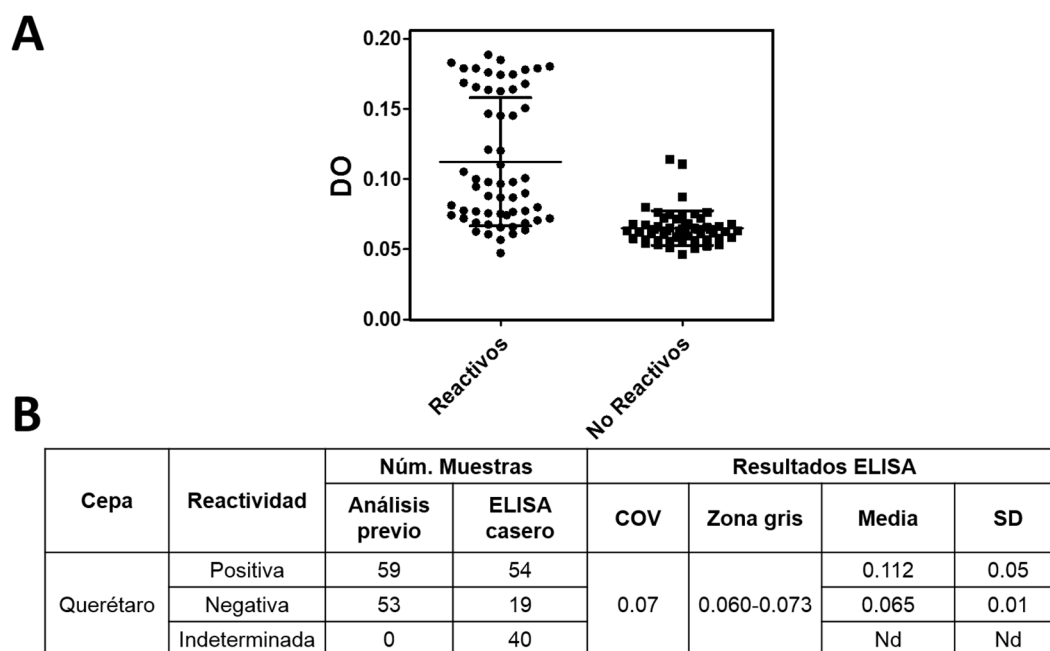


Figura 31. ELISA casero con extracto total de proteínas de tripomastigote de la cepa Querétaro. Las 59 muestras reactivas y las 53 muestras no reactivas fueron analizadas por ensayo de ELISA casero, usando extracto total de proteínas de tripomastigotes de la cepa Querétaro. **A)** Dispersión de datos obtenidos en el ensayo de ELISA, donde se representan los resultados obtenidos en la media de un ensayo realizado por triplicado, a una dilución 1:50 de los sueros, así como la desviación estándar obtenida por estos datos. **B)** Tabla general de los resultados obtenidos, valor de corte (COV), media de los resultados obtenidos y desviación estándar (SD).

Amplificación de secuencias especie-específicas

También utilizamos una prueba no convencional para la detección de *T. cruzi* en sueros humanos, se trata de la amplificación de secuencias especie-específicas, aunque es una prueba poco utilizada debido a que los ensayos serológicos se realizan en la etapa cónica de la enfermedad, y como es bien sabido, en esta etapa los niveles de parasitemia son indetectables. Habitualmente se utilizan secuencias repetidas del genoma del parásito, ya sé del cinetoplasto como del DNA nuclear, en este caso utilizamos dos secuencias repetidas del DNA genómico, la secuencia repetida C6, y la región intergénica del miniexón.

Primero realizamos una curva de detección, y ya que contábamos tanto con muestras serológicas como con muestras de sangre total, era importante identificar la sensibilidad del sistema. Realizamos una extracción de ADN de una muestra de sangre de un paciente sin evidencias de historial clínico o serológico. A la que se le adicionaron cantidades pequeñas de parásitos de la cepa Y, en cantidades decrecientes a escala logarítmica (**Figura 31**). Se evaluó tanto la sensibilidad en sangre completa como en suero. Además, se metieron como controles, muestras provenientes de ratones que fueron infectados con 1×10^5 TM de tres cepas distintas: NM1, CI2 y CL Brener.

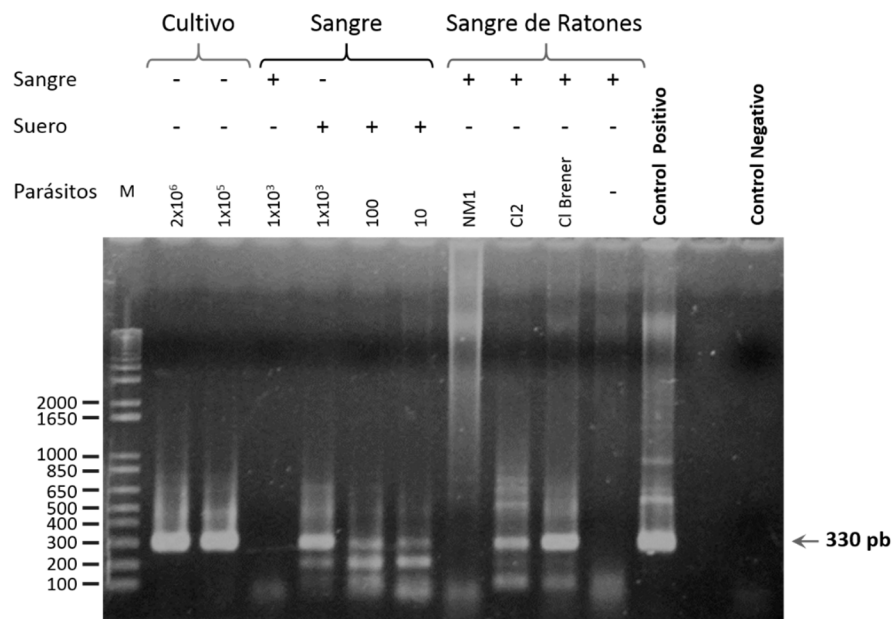


Figura 32. Detección de ADN de *T. cruzi* en muestras serológicas mediante la amplificación de la secuencia repetida C6 de DNA nuclear del parásito. Los productos de amplificación de la secuencia C6 se corrieron en geles de agarosa al 1%, obteniendo un amplificado de 330 pb. La amplificación de este producto indica que se pudo detectar de ADN del parásito presente en cantidades decrecientes en una muestra sanguínea/serológica (carriles del 4-7), así como la detección del parásito en sangre de ratones infectados con el aislado CI2 y la cepa CL Brener, carril 9 y 10 respectivamente. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa Y, y como control negativo muestra sin DNA. M= Marcador de tamaño molecular 1Kb plus de ADN ladder Invitrogen™.

La sensibilidad del sistema fue identificada en 10 parásitos para las muestras serológicas, ya que con esa cantidad fue posible obtener un amplificado de 330 pb. Sin embargo, en sangre total no fue posible detectar el DNA de mil epimastigotes. En el caso de la sangre de ratones con 150 días post-infección, observamos que a excepción de la cepa NM1, se pudo detectar el DNA contenido en la muestra biológica, procedente de un organismo infectado con *T. cruzi*.

Una vez establecidas las condiciones de sensibilidad procedimos a amplificar la secuencia C6 del ADN extraído de las muestras serológicas (**Figura 31**). Realizamos una primera amplificación, sin embargo, no pudimos detectar ADN del parásito del tamaño esperado (R4, R8, R9, NR2 y NR3) (**Figura 32A**). El resultado obtenido en los controles positivos, que consistía en sangre de ratones infectados con tripomastigotes metacíclicos del aislado CI2 y la cepa control CL Brener nos indicaban que no se debía a las condiciones de amplificación (**Figura 32B**). Por tanto, llevamos a cabo una segunda amplificación utilizando como control de detección ADN de un parásito en una alícuota de 200 µL de sangre, y como control negativo ADN de sangre libre de parásitos (**Figuras 32C y E**). Los resultados indicaron que no era posible detectar ADN de un parásito, es decir que el sistema era poco sensible, por tanto, realizamos una PCR anidada usando oligonucleótidos internos a la secuencia C6 (C6 anidado sentido 5' AAAGGCAGGAATTATCGAGGA 3', C6 anidado antisentido 5' ATCCATTGGGAGCCGTGTC 3') (**Figuras 32D y F**).

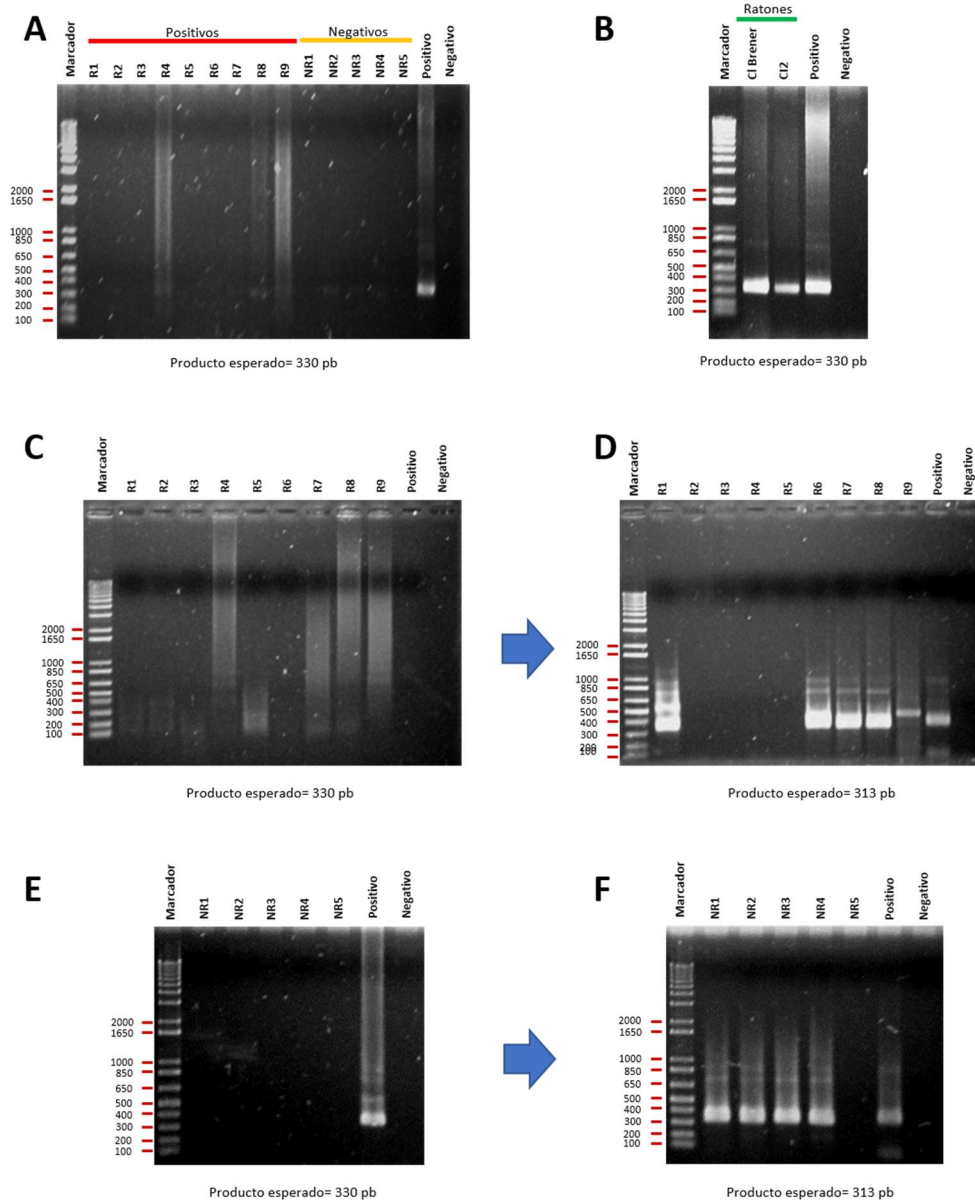


Figura 33. Detección de *T. cruzi* en muestras serológicas a través de la amplificación de la secuencia repetida C6. Los productos de amplificación fueron corridos en geles de agarosa al 1%, se obtuvo un producto de 33pb o 313 pb (PCR anidada) en aquellas muestras donde fue posible detectar ADN del parásito. **A)** Amplificación de la secuencia C6, con un producto de 330 pb para las muestras serológicas positivas. **B)** Amplificado de 330 pb de la secuencia C6 de los controles de positivos. **C)** Amplificación de la secuencia C6 de muestras serológicas reactivas a *T. cruzi*. **D)** El producto de 313 pb de una PCR anidada de la secuencia C6, indica que las muestras reactivas (en C) fueron positivas a la detección de ADN del parásito. **E)** Amplificación de la secuencia C6 de 5 muestras serológicas no reactivas a *T. cruzi*. **F)** El producto de 313 pb de una PCR anidada de la secuencia C6, indica que las muestras reactivas (en E) fueron positivas a la detección de ADN del parásito. M= Marcador de tamaño molecular 1Kb plus de ADN ladder Invitrogen™.

Los resultados mostraron una banda de 313 pb para las muestras R1, R6, R7, R8, R9, NR1, NR2, NR3, NR4 y para el control positivo. No se observó amplificación en las muestras R2, R3, R4, R5, NR5 y el control negativo. Estos resultados nos indicaban que con la PCR anidada es posible detectar la presencia de hasta de un parásito en sangre, aumentando la sensibilidad de la prueba. En el caso de las muestras reactivas en las que no se identificó el ADN de *T. cruzi*, es posible que se deba a la carga parasitaria o degradación de la muestra. Es importante señalar que se obtuvo producto de amplificación en los sueros donados como negativos, ya que este tipo de muestras muchas veces es utilizado para su uso en transfusiones sanguíneas, pudiendo transmitir la infección con *T. cruzi*.

También realizamos la amplificación del IR del miniexón de 9 muestras reactivas y 5 muestras no reactivas, como control positivo se utilizó ADN de epimastigotes en fase logarítmica de cultivo de la cepa Y, y como control negativo ADN extraído de sangre no contaminada con el parásito. Se observó una banda de 350 pb para las muestras R1, R2, R3, R5, NR1, NR2 y NR3, que además de indicar la presencia de ADN del parásito en estas muestras, muestra que este ADN proviene de parásitos TcI, mientras que, el control positivo (ADN de epimastigotes de la cepa Y) amplificó una banda de 300 pb correspondiente a TcII (**Figura 33**).

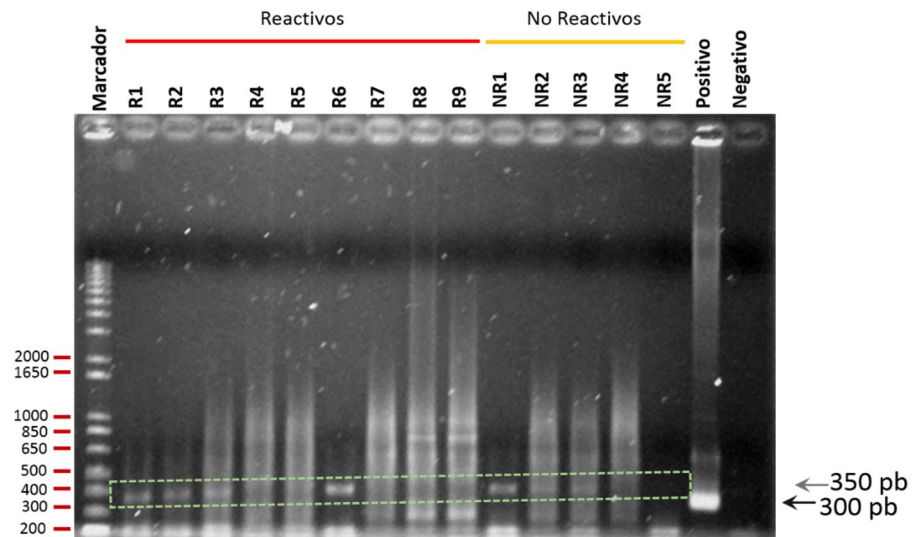


Figura 34. Detección de *T. cruzi* mediante la amplificación del IR-Miniexón de muestras serológicas. El producto de amplificación fue corrido en geles de agarosa al 1.5%, un producto de 300 o 350 pb indicaban que las muestras eran positivas a la presencia de ADN del parásito. Como control positivo de reacción se utilizó ADN de epimastigotes de la cepa Y en fase logarítmica, y como control negativo muestra libre de ADN del parásito. M= Marcador de tamaño molecular 1Kb plus de ADN ladder Invitrogen™.