

**Caracterización biológica y aportación filogenética  
de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de  
una población sinantrópica de *Didelphis virginiana*  
(Mammalia: Didelphimorphia) de la localidad de  
Molas, Yucatán, México.**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL  
GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**POR:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
MARIA ALHELI CAB ROMERO**

**Asesores:**

**Dr. Hugo A. Ruiz Piña**

**Dr. Enrique A. Reyes Novelo**

**Mérida, Yuc., México, junio de 2016**

## DECLARACIÓN DEL AUTOR

“ El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis “ Caracterización biológica y aportación filogenética de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphimorphia) de la localidad de Molas, Yucatán, México”, es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

## **Dedicatorias**

Con Amor

A mis padres Luis Fernando Cab Nicoli y Maria Librada Romero Maya por haberme dado educación, un hogar donde crecer, equivocarme, aprender y donde adquirí los valores que hoy definen mi vida.

A mis hermanos Luis Adolfo, Paola Yahzin, Maria Fernanda, Luis Fernando, Nicol Jazmin y Jandy Guadalupe por el apoyo que me brindaron día a día en el transcurso de mi vida.

A Chocolate quien cambió el argumento de mi vida.

A Jorge Baas por ser el motor y motivo que me empuja a seguir adelante.

## **Agradecimientos**

Primero que nada, esta obra no se habria realizado sin la participación de la localidad de Molas, gracias por las puertas abiertas y la confianza que depositaron para esta investigación.

El tiempo pasa y el reloj no se detiene, muchas gracias a mi familia por creer en todo momento en mi, que a pesar de los obstaculos que hemos pasado siempre me han mostrado el camino de como enfrentar mis miedos.... y aquí estoy !!!!

Un agradecimiento especial a mi compañero, mi mejor amigo, quien se ha desvelado conmigo a altas horas de las madrugada y quien me consuela en esos momentos llenos de estrés... gracias chocolate !!!

La vida nos a llevado por caminos diferentes, pero a pesar de ello siempre me has apoyado durante estos momentos de crisis y me has brindado tu hombro innumerables veces, gracias por todo Jorge Cruzziel Baas Gonzalez.

Esto va para mis amigos de la generación de la maestría: Kary, Caro, Fleites, Soto, Chano, Gera, Cocas, Jedión, Ursula, Eve, Samuel, Rox, Ángel, Julian, Luis, Mariana, Andréa e Irving. ¡Hey chicos lo logré!

A mis asesores, el Dr. Hugo A. Ruíz Piña y el Dr. Enrique Reyes Novelo quienes con su infinita dedicación y paciencia enriquecieron este trabajo. ¡Muchas gracias!

Al H. Comité Tutorial conformado por la Dra. Karla Acosta Viana y la Dra. Celia Sélem Salas por sus valiosas aportaciones durante los seminarios para la culminación de este trabajo así como al grupo sinodal compuesto por la Dra. Silvia Hernández, Dr. Manuel Bolio y Dr. Francisco Javier Escobedo por los comentarios aportados a la tesis.

Al Dr. Javier Escobedo Ortégón por su valiosos conocimientos y apoyo durante las actividades de laboratorio.

A mis maestros de la FMVZ-UADY por todas las enseñanzas en las aulas durante estos dos años ¡Muchas gracias!

Al Dr. Roger Ivan Rodriguez Vivas por todos sus valiosos consejos a lo largo de la elaboración de la tesis.

Al Dr. Arlei Marcili por su invaluable apoyo durante la fase de desarrollo de este trabajo, los conocimientos adquiridos durante la estancia en la FMVZ-VPS y sus consejos durante todo este trayecto que me han ayudado para dar mi primer paso como investigadora. Muito Obrigada!.

A mis amigos del Departamento de Medicina Preventiva y Salud animal-VPS, en especial a Andréa Pereira, Francisco Costa, Bruna Matarucco y Juliana Silva, quienes con su paciencia y amor a la ciencia colaboraron con este trabajo.

A Sergio Daniel Pérez Preciado de la Universidad de Tolima, Ibagué Colombia quien me ayudo en la fase experimental de mi trabajo y nunca se quejó; gracias por tus consejos sobre evolución y aquellas pláticas sobre *Trypanosoma* en la USP....camundongo, camundongo, camundongo, cultivo, cultivo y crucigramas.

A los amigos que conocí en la larga jornada de muestreo: Marco Torres, Alonso Panti, Gabriela Guardado, Yeymy Castillo, Fanny Quijano, Yaniré Aguirre, Juan Canto y Alan Cuxim. ¡Muchas gracias por su apoyo!

No puedo olvidar a los amigos de diferentes lugares que hicieron esta labor más divertida y que de alguna manera marcaron este trabajo como: José Antonio Guzmán, Markéta Nováková, Solange Oliveira, Sebastian Muñoz, Marcos Gomes, Natalia Orozco, Juliana Aizawa, Luis Ramiro, Renato Caravieri y Karinne Marques.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente y dejaron huella de alguna manera durante este largo camino les agradezco infinitamente.

A CONACYT por la beca otorgada para el estudio de la maestría.

Al proyecto Monitoreo, vigilancia e intervención de patógenos zoonóticos y ETVS en un área rural del estado de Yucatán. Financiado por Promep 103.5/13/5270.

## Resumen

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) comprende poblaciones altamente heterogéneas clasificadas dentro de seis Unidades Discretas de Tipificación (UDT) nombradas Tc-I a Tc-VI. La historia evolutiva de *T. cruzi* tiene una asociación muy fuerte con sus hospederos mamíferos y algunos estudios filogenéticos y ecobiológicos sugieren que tanto los ecotopos, los hospederos y los vectores son factores que determinan los diferentes linajes de *T. cruzi*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar biológica y filogenéticamente los aislados de *T. cruzi* de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* de la localidad de Molas, Yucatán. Para lo anterior, se seleccionaron 40 viviendas y se colocó una trampa Tomahawk Inc.® en cada patio. El proceso del muestreo se repitió mensualmente de enero a mayo del 2014. Se capturaron 66 individuos, a los cuales se les aplicó la técnica de marcaje-recaptura con una perforación de dos mm en la oreja. A cada uno se le extrajo sangre, de los cuales 18 fueron positivos con la técnica de PCR y de estos se obtuvieron ocho aislados de *T. cruzi* que se mantuvieron en cultivos axénicos para su análisis filogenético con los genes SSU ADNr, gGAPDH y Cyt B con el fin de describir su relación entre ellos y clasificarlos dentro de las diferentes UDT. Por otro lado, el comportamiento biológico de estos aislados se observó mediante la inoculación de tripomastigotes metacíclicos en ratones BALB/c para determinar la mortalidad y la parasitemia durante 30 días. Los resultados confirmaron una fuerte asociación de *Didelphis virginiana* (*D. virginiana*) con Tc-I y los ratones BALB/c presentaron dos diferentes patrones de comportamiento, el primer patrón mostró una baja parasitemia sin mortalidad y el segundo mostró una parasitemia mayor durante los primeros días del experimento con un 100% de mortalidad entre los días 13 y 14 post-infección. De esta manera se comprueba que *D. virginiana* representa un reservorio de *T. cruzi* en Yucatán y que a pesar de que los diferentes aislados del parásito pertenecen a Tc-I, la virulencia diferenciada del parásito muestra que estas cepas podrían estar moduladas por las diferentes poblaciones del insecto vector, los animales silvestres o peridomésticos.

**Palabras Clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Didelphis virginiana*, UDT, Filogenia, Parasitemia, Molas, Yucatán, México.

## Summary

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) comprises highly heterogeneous populations classified within six Discrete Typing Unit (DTU's) named Tc-I to Tc-VI. The evolutionary history of *T. cruzi* has a very strong association with their mammal hosts and some phylogenetic and ecobiologically studies suggest that ecotopes, hosts and vectors are factors that determine the different lineages of *T. cruzi*. Therefore, the aim of this study was to characterize biological and phylogenetically the isolates of *T. cruzi* from synanthropic individuals of *Didelphis virginiana* captured in the village of Molas, Yucatan. Forty households were selected in the village of Molas where a trap Tomahawk Inc.® was placed in the yard of each house. Sampling was repeated monthly from January to May of 2014. Sixty six individuals were captured, which were applied the mark-recapture technique with a drilling two mm in ear were captured and a blood sample was extracted, of which 18 were diagnosed as *T. cruzi* infected by a PCR procedure. From these, eight isolates of *T. cruzi* were obtained and kept in axenic culture for phylogenetic analysis with SSU rDNA, gGAPDH and Cyt B genes to describe the relationships between them and classify them into the different DTU's. Furthermore, the biological behavior of these isolates was observed by inoculating metacyclic trypomastigotes in BALB/c to follow up the parasitaemia and mortality by 30 days. The results showed a strong phylogenetic association of *T. cruzi* isolated from the sampled *Didelphis virginiana* (*D. virginiana*) with Tc-I, while that BALB/c mice showed two different patterns of parasitaemia behavior, the first pattern showed a low parasitaemia without mortality and the second showed a higher parasitaemia during the first days of the experiment with 100% mortality between days 13 and 14 post-infection. Thus, *D. virginiana* represents a reservoir of *T. cruzi* in Yucatan and although the different isolates of the parasite belonged to Tc-I, differentiated parasite virulence shows that these strains could be modulated by the different populations of the insect vector, wild animals or peridomestic animals.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Didelphis virginiana*, DTU's, Phylogeny, Parasitaemia, Molas, Yucatan, Mexico.

## Índice general

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 El género <i>Trypanosoma</i> , filogenia y evolución.....	3
2.2 Subgénero <i>Schizotrypanum</i> .....	4
2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
2.4 Hospederos invertebrados- vectores.....	6
2.5 Historia de los marsupiales en las Américas- <i>Didelphis virginiana</i> como hospedero sinantrópico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
2.6 Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
2.7 Enfermedad de chagas (EC) y su distribución.....	10
2.8 Diversidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
2.9 Genes utilizados para la filogenia y taxonomía de los tripanosomas.....	15
3. Objetivos e Hipótesis.....	18
3.1 Objetivo.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
3.3 Hipótesis.....	18
4. Referencias.....	19
 Artículo: Caracterización filogenética y biológica de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de una población sinantrópica de <i>Didelphis virginiana</i> de Yucatán, México.....	 37
 Resumen.....	 37
1. Introducción.....	38
2. Materiales y métodos.....	40
2.1 Descripción del área de estudio.....	40
2.2 Diseño del estudio y captura de <i>Didelphis virginiana</i> .....	40
2.3 Obtención de muestras.....	41

2.4	Reacción de cadena de la polimerasa para el diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Didelphis virginiana</i> .....	42
2.5	Crecimiento y manutención de los cultivos axénicos.....	43
2.6	Reacción de PCR para amplificar un fragmento de ADN con los genes ITS, Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH.....	44
2.7	Determinación del linaje mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de sitios de restricción de ADN amplificados por PCR.....	46
2.8	Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN (Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH) previamente amplificados por PCR.....	46
2.9	Alineamiento de las secuencias obtenidas.....	46
2.10	Análisis filogenético.....	47
2.11	Comportamiento biológico de los cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
2.11.1	Animales experimentales.....	47
2.11.2	Infección en los animales de experimentación.....	48
2.11.3	Análisis.....	48
3.	Resultados.....	48
3.1	Diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Didelphis virginiana</i> .....	48
3.2	Genotipificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR-RFLP de los espaciadores intergénicos transcritos (ITS).....	49
3.3	Caracterización filogenética de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de <i>Didelphis virginiana</i> de la localidad de Molas, Yucatán.....	50
3.4	Caracterización biológica en modelo murino infectados de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> de <i>Didelphis virginiana</i> .....	54
4.	Discusión.....	56
4.1	La importancia entre los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> y las relaciones genéticas entre ellos.....	56
4.2	Comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
4.3	Importancia de <i>Trypanosoma cruzi</i> para la salud pública.....	60
5.	Conclusiones.....	62

6. Referencias.....64

## Índice de figuras

Figura 1. Ubicación geográfica de la localidad de Molas, Yucatán, México.....	41
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que amplifican la banda de 188 pb para el gen TcZ1- TcZ2 a partir de muestras sanguíneas de <i>Didelphis virginiana</i> capturadas en Molas, Yucatán.....	49
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con SYBR que amplifica la banda de restricción de 250 pb obtenidos por PCR-RFLP de los amplificadores con el gen ITS1 ADNr después de la digestión con la enzima <i>Bsh</i> 1236I a partir de muestras sanguíneas de <i>D. virginiana</i> capturadas en Molas, Yucatán.....	49
Figura 4. Árbol filogenético por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen Cyt B con 19 secuencias de tripanosomátidos del GenBank.....	51
Figura 5. Árbol filogenético por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen SSU ADNr con 48 secuencias de tripanosomátidos del GenBank con <i>T. rangeli</i> como grupo externo.....	52
Figura 6. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen gGAPDH con 20 secuencias de tripanosomátidos del GenBank con <i>T. dionisii</i> como grupo externo.....	53

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
Cuadro 2. Nomenclatura de las seis UDT de <i>T. cruzi</i> .....	14
Cuadro 3. Cebadores para amplificar un segmento de ADN para caracterizar molecularmente los aislados de <i>T. cruzi</i> .....	45
Cuadro 4. Comportamiento de los aislados de <i>T. cruzi</i> en ratones BALB/c inoculados experimentalmente con tripomastigotes metacíclicos procedentes de la localidad de Molas, Yucatán, México.....	55

## Abreviaturas y siglas usadas en el documento

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNk	Ácido Desoxirribonucleico del cinetoplasto
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
AW <sub>0</sub>	Cálido subhúmedo con lluvias en verano
B	Análisis Bayesiano
BAB	Agar Base Sangre (por sus siglas en inglés “Blood Agar Base”)
CBT	Colección Brasileña de Trypanosomátidos
CytB	Citocromo B
<i>D. virginiana</i>	<i>Didelphis virginiana</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EC	Enfermedad de Chagas
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
<i>ExoI</i>	Exonuclease I
ExoSAP	Exonucleasa Fosfatasa Alcalina (por sus siglas en inglés “Exonuclease Shrimp Alkaline Phosphatase”)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTR	General Time Reversible

Kb	Kilobases
LIT	Liver Infusion Tryptose
MH	Microhematocrito
MP	Máxima Parsimonia
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Peso Corporal Vivo
pH	Potencial de hidrógeno
RAPD	Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico
RFLP	Polimorfismos de Longitud Fragmentos de Restricción
RPM	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SSU	Small subunit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampon Tris EDTA
TBE	Tris Ácido Bórico EDTA
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. dimidiata</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>
UDT	Unidades Discretas de Tipificación
USP	Universidad de São Paulo

## 1. Introducción

El origen de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) data de hace 80 millones de años en el super continente del sur (Antártida, Australia y América del Sur) en donde la fauna nativa inicialmente estaba compuesta por marsupiales y edentados. Más tarde, las olas de migración transportaron a los roedores caviomorfos y primates de África, murciélagos y carnívoros (Briones *et al.*, 1999; Buscaglia *et al.*, 2003).

Con el paso del tiempo *T. cruzi* se adaptó a los diferentes mamíferos y se inició la adquisición de los hábitos hematófagos de los vectores (Schofield *et al.*, 2009) para desarrollar el ciclo digenético en donde actuaron diferentes presiones selectivas dando lugar a una extensa variedad de poblaciones de *T. cruzi* con diferencias en el comportamiento biológico y molecular (Jansen *et al.*, 2010).

En 1909, Carlos Chagas identificó al protozooario flagelado *T. cruzi*, transmitido al hombre por insectos hematófagos infectados, pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*. Se estableció el carácter zoonótico con el nombre de tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas (EC) con una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, actualmente se considera una patología parasitaria que ocasiona estragos en la salud pública y la economía en América Latina (Chagas, 1909; WHO, 2002; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012 ).

En el 2003, Gaunt *et al.* demostraron que *T. cruzi* posee una evolución clonal con eventos de intercambios genéticos, proponiendo seis unidades discretas de tipificación (UDT) nombradas como Tc-I a Tc-VI (Zingales *et al.*, 2009), las cuales están presentes en diferentes ecotopos que determinan la ecología evolutiva del parásito en una región y asocia caracteres biológicos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Zingales *et al.*, 2012).

En México, se han realizado estudios sobre caracterización molecular y biológica de *T. cruzi* obtenidos de triatominos, mamíferos hospederos y casos humanos, los cuales revelan la presencia de *T. cruzi* grupo I principalmente en el sureste de México y *T. cruzi* II en el centro de este país, de igual manera se han detectado variaciones en el comportamiento biológico a nivel de parasitemia, mortalidad y tropismo en modelos murinos (Espinoza *et al.*, 1998;

Barrera-Pérez *et al.*, 2001; Bosseno *et al.*, 2002; Bosseno *et al.*, 2009 ; Gomez-Hernandez *et al.*, 2011; Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

Sin embargo, los estudios al respecto son muy escasos pero han revelado que las poblaciones de *T. cruzi* circulan entre los hospederos mamíferos, vectores y ecotopos de una manera selectiva dependiendo de la asociación (parásito-hospedero). A partir de esto, el presente estudio se realizó en la localidad de Molas, Yucatán en donde la cercanía de las especies silvestres, animales domésticos y triatominos pueden presentar un riesgo para la transmisión de *T. cruzi* al ser humano.

Resalta la importancia de *Didelphis virginiana* (*D. virginiana*) debido a su comportamiento sinantrópico, el papel como hospedero que mantiene a este parásito en el peridomicilio rural (Ruiz-Piña *et al.*, 2002; Parada-López *et al.*, 2013), su gran capacidad de adaptación y su desplazamiento entre diferentes ecotopos que lo convierten en un modelo ideal.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar biológica y filogenéticamente los aislados de *T. cruzi* que circulan en la población sinantrópica de *D. virginiana* de la localidad rural de Molas, Yucatán, México.

## 2. Marco teórico

### 2.1 El género *Trypanosoma*, filogenia y evolución

El género *Trypanosoma* pertenece a la familia Trypanosomatidae que comprende protozoarios flagelados pertenecientes a la orden Kinetoplastida, actualmente clase Kinetoplastea y este orden se caracteriza por la presencia de una sola mitocondria con una región rica en ADN, llamado cinetoplasto (ADNk) que consiste en moléculas de ADN de doble hebra circulares, llamadas minicírculos y maxicírculos que se encuentran concatenados en una sola red. Al parecer, estos organismos se separaron de otros eucariotes después que el antepasado de este linaje incorporó bacterias aeróbicas simbiotes que dieron lugar a las mitocondrias (Simpson *et al.*, 2000,2002; Lukes *et al.*, 2002).

Un sistema reciente de clasificación propone la separación de la clase Kinetoplastea en dos subordenes: Prokinetoplastina, que abarca ectoparásitos de peces y endosimbiontes de protozoarios ameboides y Metakinetoplastina que consiste en 4 grupos principales, 3 clados de bodonidos (Neobodonida, Parabodonida y Eubodonida) y el clado de los tripanosomátidos (Trypanosomatida) (Moreira *et al.*, 2004).

Los tripanosomátidos forman un grupo monofilético que pertenece a la familia Trypanosomatidae. Estos organismos son parásitos obligatorios de invertebrados, plantas y todos los ordenes de los vertebrados con amplia distribución en diferentes continentes (Vickerman, 1976; Simpson *et al.*, 2006; Stevens, 2008).

Estos presentan diversas características de gran interés filogenético y evolutivo, tales como: la presencia y estructura del cinetoplasto, la composición del citoesqueleto, el aislamiento de las enzimas glicolíticas en los glicosomas, las proteínas de membrana ancladas por GPI (Glicosilfosfatidilinositol), la endocitosis y exocitosis de las macromoléculas a través de la bolsa flagelar, un nucleótido no usual denominado base J en su ADN nuclear, la ausencia de la condensación cromosómica durante la mitosis, la variación antigénica, la transcripción policistronica, el mecanismo de procesamiento ARNm por transplicing, la edición de ARN

mitocondrial etc. (Vickerman, 1994; Doijees *et al.*, 2000; Gull, 2001; Simpson *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2005).

Actualmente, la hipótesis mejor apoyada sobre los organismos del género *Trypanosoma* es la del origen monofilético, con un ancestro común para todas las especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Hollar *et al.*, 1997; Wrigth *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1998, 1999a, 2001; Lukes *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2004).

## **2.2 Subgénero *Schizotrypanum***

El subgénero *Schizotrypanum* comprende tripanosomas que infectan al hombre y a otros mamíferos; con excepción de *T. cruzi*, las demás especies de este subgénero están restringidas a los murciélagos. Mientras que *T. dionisii* y *T. vespertilionis* fueron descritos en el nuevo y viejo mundo, *T. cruzi* está restringido a América Latina y *T.c. Marinkellei* se encuentra solamente en América Central y Sudamérica (Hoare, 1972; Molyneux, 1991).

El origen evolutivo de *T. cruzi* y de todo el subgénero *Schizotrypanum* ha sido ampliamente discutido; la posición del tripanosoma de un canguro (Australia) en los árboles filogenéticos ha resultado próximo al clado que contiene a *T. cruzi* y otras especies del subgénero de *Schizotrypanum*, sugiriendo que esta especie proviene de un ancestro de los marsupiales que existieron antes de la separación entre América del Sur y Australia hace 70-100 m.a (Stevens *et al.*, 1999b,2001).

Sin embargo, algunos análisis filogenéticos sugieren que el tripanosoma ancestral fue restringido a los quirópteros y su existencia se estableció en el viejo mundo que dio origen a *T. cruzi*. Esta hipótesis se basó en el hecho que las especies de *Schizotrypanum* son exclusivas de murciélagos y algunas son cosmopolitas, siendo *T. cruzi* generalmente de mamíferos y restringido a América Latina (Brisse *et al.*, 2003). La actual distribución de las especies de

*Schizotrypanum* y la capacidad de dispersión de los murciélagos por largas distancias incluyendo océanos hace posible las dos hipótesis (Stevens *et al.*, 1999b).

### 2.3 *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la EC o tripanosomiasis Americana es *T. cruzi*. Este parásito es un protozooario hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y familia Tripanosomatidae (Cuadro 1).

En 1909, el científico Carlos Chagas describió el agente causal de la EC y los vectores que la transmiten pero algunos investigadores no creían de la validez de sus hallazgos. En el año de 1926, Salvador Mazza revalorizó los estudios de Carlos Chagas y definió por primera vez las etapas clínicas de evolución en humanos (Pinto, 1984).

Este parásito en función de su comportamiento se agrupa en la sección Estercoraria, debido a que se desarrolla en el tubo digestivo del vector, con la liberación de las formas infectivas en las heces (Hoare, 1972).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

<b>Filo:</b>	Euglenozoa
<b>Clase:</b>	Kinetoplastea
<b>Orden:</b>	Kinetoplastida
<b>Sub. Orden:</b>	Trypanosomatina
<b>Familia:</b>	Trypanosomatidae
<b>Género:</b>	<i>Trypanosoma</i>
<b>Sub. Género:</b>	<i>Schizotrypanum</i>
<b>Especie:</b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Tomado de NCBI (National Center for Biotechnology Information), 2012.

A medida que pasa de un hospedero vertebrado al invertebrado sufre de cuatro formas morfológicas principales :

- a) Los tripomastigotes presentan una forma de “C” o “U” con una longitud de 15 a 25  $\mu\text{m}$ , un núcleo central, el cinetoplasto grande y subterminal del cual emerge un flagelo que se prolonga más allá del cuerpo, formándose una membrana ondulante.
- b) Los amastigotes son de forma redondeada de 2-4  $\mu\text{m}$ , presentan un núcleo así como también un cinetoplasto central y un flagelo muy pequeño intracelular.
- c) Los epimastigotes son fusiformes miden de 20-30  $\mu\text{m}$  de largo, presentan el cinetoplasto anterior al núcleo central y la membrana como el flagelo son más cortos.
- d) Los tripomastigotes metacíclicos son de forma similar a los tripomastigotes sanguíneos, pero más largos y delgados, el flagelo inicia en la parte posterior del parásito y emerge libre en la parte anterior, formando en su trayecto submembranal una membrana ondulante, el cinetoplasto es grande y de ubicación subterminal (Acha *et al.*, 2003; Uribarren, 2013).

#### **2.4 Hospederos invertebrados - vectores**

Los hospederos invertebrados ó vectores de *T. cruzi* son insectos hematófagos obligados que pertenecen al orden Heteroptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. La mayoría de estas especies se encuentran en el continente Americano con excepción del género *Linshcosteus* en la India y de *T. rubrofasciata* que se encuentra distribuido en todas las regiones del trópico (Schofield, 1988; Schofield, 2000).

Los registros fósiles de la familia Reduviidae, sugieren que sus ancestros hemípteros fueron fitófagos del periodo Pérmico/ Triásico (~230 m.a). La adaptación hacia la hematofagia es un proceso reciente que ocurrió gradualmente y la hipótesis más probable de la hematofagia obligada se derivó de hábitos depredadores seguido de hematofagia facultativa (Schofield, 2000).

Los triatominos están divididos en seis tribus con 18 géneros conformados por cerca de 140 especies, de las cuales 105 pertenecen al nuevo mundo y los géneros más importantes como vectores de la EC son: *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus* (Carcavallo *et al.*, 1999; Tartarotti *et al.*, 2006).

Un aspecto que destaca en la historia evolutiva de *T. cruzi* es la asociación de poblaciones (linajes) con los géneros y especies de triatomíneos y sus respectivos ecotópos o nichos ecológicos. El género *Triatoma* es terrestre asociado con hábitats rocosos, algunas especies de *Triatoma* pueden ser encontradas exclusivamente en los huecos de los árboles o en los nidos de los pájaros mientras que otras tienen una preferencia por rocas o cavernas. Algunas especies manifiestan una relación estrecha con un ecotopo, sin embargo, otras especies presentan una gama de ecotópos como *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*) (Gaunt *et al.*, 2000).

En México, cerca del 96% de la transmisión de *T. cruzi* se realiza por vía vectorial, comprendiendo un grupo muy diverso con 39 especies documentadas y al menos 21 de ellas han sido encontradas infectadas naturalmente con este parásito (Carabarin *et al.*, 2013; Uribarren, 2013).

Una de las principales especies que actúan como vectores de *T. cruzi* es *T. dimidiata* en los países de América Central, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú así como en 12 estados de México entre los cuales está Yucatán. La importancia de este vector radica en su capacidad para ocupar diversos hábitats domésticos, peridomésticos y silvestres tanto de áreas rurales como periurbanas y urbanas (Zeledón *et al.*, 1973; Ponce, 2007, OPS, 2007).

En Yucatán existen varios reportes sobre las preferencias alimenticias de este triatomino en donde la antropofilia ocupa el primer lugar, seguido de aves, perros y zarigüeyas (Guzman-Marín *et al.*, 1992). Por otro lado, la abundancia de triatominos en la península de Yucatán se ha asociado con la vegetación perturbada por actividades humanas (agricultura y pastizales) (Dumonteil y Gourbière, 2004) y se estimó que su dispersión entre diferentes ecotopos (doméstico, peridoméstico y selvático) es alta (Dumonteil *et al.*, 2007), de igual forma se ha documentado por Ramírez-Sierra *et al.* (2010) que el comportamiento de las hembras de *T. dimidiata* infectadas con *T. cruzi* se dispersan más que las no infectadas.

## **2.5 Historia de los marsupiales en las Américas - *Didelphis Virginiana* como hospedero sinantrópico de *Trypanosoma cruzi***

Los primeros mamíferos surgieron en el periodo Triásico con un tamaño pequeño, al final del Jurásico e inicio del Cretáceo estos animales presentaban una gran variedad de especies que habitaron en la era Cenozoica conocida como la “Era de los mamíferos” (Pought *et al.*, 2003).

Los primeros registros de los marsupiales en las Américas se remonta en el periodo Cretáceo y se consideran los mamíferos más antiguos (Schofield, 2000). De acuerdo con los registros fósiles encontrados en Sudamérica (Perú y Bolivia) y Norteamérica son similares entre sí (entre 140 y 65 m.a), pero sostienen que los restos encontrados en Norteamérica son más antiguos que los encontrados en el Sur, por lo tanto sugieren que los marsupiales tuvieron su origen en Norteamérica, se irradiaron hacia Sudamérica y luego se extinguieron en su lugar de origen. Millones de años más tarde, durante el periodo Terciario, se dispersaron hacia Australia y Nueva Guinea vía Antártica, luego se reintrodujeron a Norteamérica durante el Plioceno (6 m.a) con el surgimiento del istmo de Panamá (Emmons y Feer, 1997) y posteriormente se generó una amplia distribución en América del Sur. Se extinguieron de la Antártica cuando se posicionó en el Polo Sur y en la actualidad solo sobreviven en Australia y América (Hernandez y Mora, 2005; Schofield, 2000; Nilsson *et al.*, 2004).

Existe un total de 180 especies de mamíferos naturalmente infectados con *T. cruzi* (Noireau *et al.*, 2009), entre los cuales se encuentra la familia Didelphimorphia que consta de 11 géneros y 77 especies. El género *Didelphis* se distribuye desde el sureste de Canadá hasta la región central de Argentina (Nowak, 1991; Gardner, 1973).

Se reconocen seis especies : *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. phisimperfect* y *D. pernigra*. Entre ellas destaca *D. virginiana* de hábitos nocturnos, alimentación omnívora y considerada generalista, oportunista y exitosa, capaz de habitar cualquier ambiente incluso con perturbaciones antropogénicas, además que la susceptibilidad a la infección de *T. cruzi* es muy alta y tiene una parasitemia persistente con gran capacidad para infectar vectores triatomínicos (Hamilton, 1951; Schweigmann *et al.*, 1997).

Por lo tanto, esta cercanía tan estrecha con la población humana, el riesgo de transmisión oral del parásito mediante las secreciones de las glándulas anales, así como una fuente de alimento para los insectos vectores convierten a este mamífero como un hospedero de mantenimiento de las poblaciones de *T. cruzi* con un papel importante en la unión de los ciclos silvestres y domésticos (Deane *et al.*, 1986; Urdaneta- Morales y Nironi, 1996).

## **2.6 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra varias etapas de desarrollo que están comprendidas en diferentes organismos (vertebrado y vector) y material biológico (el torrente sanguíneo y las células hospederas del vertebrado) (De souza *et al.*, 2010).

Cuando el insecto triatomino se alimenta de la sangre del hospedero infectado, ingiere las formas circulantes en ellas (tripomastigotes sanguíneos), una vez ingeridas la mayoría de los parásitos son lisados en el estómago del insecto (Castro *et al.*, 2007).

Los tripomastigotes que sobreviven se transforman en esferomastigotes y epimastigotes. Los epimastigotes migran al intestino donde se adhieren a la membrana perimicroviliar y entran en división binaria (Alves *et al.*, 2007). Después se desplazan hacia la región posterior del intestino, llamado recto. La mayoría de estas formas se adhieren a la cutícula rectal, donde sufren una transformación hacia la forma de tripomastigote metacíclico (metaciclogénesis) que es la forma infectante, luego son liberados junto con las heces y orina, siendo capaces de infectar a un nuevo hospedero a través de las membranas mucosas o aberturas en la piel por medio del rascado a causa de la picadura.

Este parásito coloniza el torrente sanguíneo donde es llamado tripomastigote sanguíneo e invade las células circundantes, en donde inicia la transformación hacia la forma amastigote en el citoplasma de la célula hospedera, ahí sufre el proceso de división binaria por varios días dependiendo de la cepa de *T. cruzi*. Posteriormente, (al quinto día) comienza la transformación a tripomastigotes generando movimientos constantes en la célula desencadenado la lisis, estas formas tienen la capacidad de invadir nuevas células o de salir al torrente sanguíneo distribuyéndose por todo el organismo. El ciclo de vida concluye o se

reinicia cuando el insecto se alimenta de la sangre de un hospedero con tripanosomas circulantes (De souza *et al.*, 2010).

Existen 3 ciclos de transmisión de *T. cruzi* debido a la compleja interacción que existe entre vectores, reservorios y ambiente : 1) el silvestre o selvático en donde las cepas del protozooario circulan entre los insectos vectores y los reservorios silvestres guardando un equilibrio entre éstos con una preferencia en ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos dependiendo de factores como : clima, altitud, humedad, características fauno florísticas y disponibilidad de alimentos, 2) doméstico o intradomiciliario, en el cual los vectores se adaptan a las viviendas humanas estableciéndose una interacción con reservorios domésticos de esta manera incluye la infección al ser humano y la consecuente EC, 3) peridoméstico, el cual comprende mamíferos que habitan en el peridomicilio y guardan un contacto cercano con el ser humano y sus viviendas, así como triatomas silvestres atraídos por el alimento y las luces de la viviendas (Teixeira *et al.*, 2009; Coura *et al.*, 2009).

## **2.7 Enfermedad de Chagas (EC) y su distribución**

La tripanosomiasis Americana o EC es una zoonosis potencialmente mortal que representa un importante problema en la salud pública de 21 países de América Latina (WHO, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la reconoce como una de las enfermedades tropicales desatendidas que afecta principalmente a las poblaciones de escasos recursos y su persistencia esta ligada a procesos sociales, culturales, históricos, políticos y económicos (Reidpath, 2011).

En un principio los casos de la enfermedad estaban confinados a la región de Latinoamérica, pero se propagó hacia los Estados Unidos, Canadá, Europa, Japón y Australia debido principalmente a la migración de la población (WHO, 2013).

La OMS calcula que existen entre 7 y 8 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina. Adicionalmente, se ha estimado que se encuentran en riesgo de adquirir la infección aproximadamente 25 millones de personas, con 56,000 nuevos casos anuales y 12,000 muertes al año (WHO, 2013; Uribarren, 2013).

El censo nacional llevado a cabo por la INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) en el 2010 reportó 112.3 millones de personas infectadas en México y basado en el porcentaje de seropositividad publicado por Cruz- Reyes y Pickering-Lopez (2006) se estimó el número de personas infectadas en 5.5 millones. Sin embargo, hasta la fecha esta enfermedad sigue siendo subestimada y por lo tanto no hay datos reales disponibles sobre la carga y distribución de la enfermedad (Carabarin *et al.*, 2013).

En México hay un total de 18 áreas endémicas localizadas en el sureste que incluyen los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán, sin embargo, se ha observado una alta prevalencia en el noreste del país que corresponde a la zona central tropical en los estados de Hidalgo, San Luis Potosi, Veracruz y Tamaulipas llamada la Huasteca (Carabarin *et al.*, 2013).

## **2.8 Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* es una especie heterogénea compuesta por varias poblaciones que circulan en los ambientes silvestres y domésticos, entre los seres humanos, animales reservorios y vectores (Zingales *et al.*, 1998). Su variabilidad se refleja en su morfología, enzimas específicas (Miles *et al.*, 1978), patrones de infectividad y patogenicidad (Mortara *et al.*, 2005), susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos (Brenner *et al.*, 1976), propiedades inmunológicas (Di noia *et al.*, 2002) y tropismo tisular en animales de experimentación (Andrade, 1982) asociadas a las características bioquímicas y moleculares del parásito.

Diversos trabajos con diferentes modelos experimentales demostraron que *T. cruzi* presenta una gran variabilidad en sus propiedades biológicas (Bice *et al.*, 1970; Andrade, 1974; Brenner *et al.*, 1976; Filardi *et al.*, 1987), considerando que *T. cruzi* presenta una evolución principalmente clonal, por esta razón se espera una evolución paralela entre la divergencia filogenética de diferentes clones y genes que dirigen importantes propiedades del parásito relacionadas con la virulencia, la patogenicidad y la epidemiología de la enfermedad, por lo que esta evolución no independiente implicaría una fuerte correlación entre la variabilidad genética del parásito y estas propiedades (Tibayrenc, 2003).

Por lo tanto, los genotipos de *T. cruzi* que son filogenéticamente próximos tendrían propiedades biológicas semejantes y los genotipos filogenéticamente separados presentarían propiedades distintas entre sí (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1988).

Por esta razón, la caracterización de la estructura poblacional de *T. cruzi* tiene como meta esclarecer la relación entre los subgrupos de parásitos y los aspectos eco-epidemiológicos y clínicos de la infección (Macedo *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2009). Sin embargo, esto se ha realizado mediante distintos métodos que ha dado lugar a varias clasificaciones, entre las cuales se encuentran:

- 1) Ensayos bioquímicos. Los primeros estudios encaminados al análisis de variantes electroforéticas de isoenzimas (MLEE por sus siglas en inglés “Multi-Locus Enzyme Electrophoresis”) permitió identificar a *T. cruzi* en 3 zimodemos, Z1, Z2 y Z3 (Miles *et al.*, 1977,1978), en donde Z2 está relacionado con el ciclo de transmisión doméstico mientras que Z1 y Z3 predominan en el ciclo silvestre. Otro estudio clasificó a Z2 de acuerdo al origen geográfico de las cepas y las denominó como Z2 Bolivia, Z2 Brasil y Z2 Paraguay (Tibayrenc *et al.*, 1983; Chapman *et al.*, 1984).

Estos estudios analizaron el modo de multiplicación de *T. cruzi* en la naturaleza y se concluyó que *T. cruzi* se multiplica de manera asexual generando así una estructura de las poblaciones generalmente clonal con la implicación de entidades independientes (clones) las cuales pueden presentar propiedades biológicas diferentes (Tibayrenc *et al.*, 1981,1988,1991). Posteriormente, Brisse *et al.* (2000) propuso la división de los Z2 y Z3 en 5 sublinajes (Tc IIa- IIe), las cuales se correlacionaron con sus ciclos epidemiológicos en diversas regiones de Latinoamérica. Se les asignó el nombre de UDT (Tc I-IIa-e), las cuales están basadas en estudios de isoenzimas de 22 loci y RAPD (por sus siglas en inglés “Random Amplified Polymorphic DNA”).

- 2) Ensayos de biología molecular. Los estudios realizados mediante la restricción enzimática a nivel del ADNk (Morel *et al.*, 1980; Vago *et al.*, 1996) en bandas de digestión cepa-específica dio lugar a la clasificación de *T. cruzi* en esquizodemos. Sin embargo, la técnica fue simplificada mediante PCR-RFLP (del inglés “Restriction

Fragment Length Polymorphism”) de la región variable del minicírculo del cinetoplasto (Sturm *et al.*, 1989) con la observación de una correlación entre zimodemos y esquizodemos, sugiriendo que los genes nucleares estudiados y el ADNk tuvieron una evolución paralela (Montamat *et al.*, 1999). Pero esta clasificación no fue adecuada debido a la amplia heterogeneidad en los perfiles de este método.

Más tarde, se utilizó el ADNr y la región intergénica del miniexón o “spliced-leader” (SL-IR), los cuales permitieron dividir a *T. cruzi* en dos grupos principales y en algunos aislados se observó la presencia de híbridos (monofiléticos) (Souto *et al.*, 1993; Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998), basado en el análisis de estas secuencias conservadas se definieron como grupos *T. cruzi* I y II (Anónimo, 1999). Posteriormente, la creación de un algoritmo de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) basado en las secuencias de la SL-IR y de los genes ADNr 24α y 18S permitió la clasificación de *T. cruzi* en seis linajes (I, IIa, IIb, IIc, IId y IIe) (Brisse *et al.*, 2001).

Debido a las múltiples nomenclaturas y la falta de métodos estandarizados para la tipificación del parásito se generó una obstrucción en el estudio de la diversidad de *T. cruzi*, sin embargo, existe una postura respecto a que *T. cruzi* está conformado por un patrón paradigmático de evolución clonal con una baja tasa de recombinación genética, demostrado en laboratorio al producir clones híbridos (Gaunt *et al.*, 2003); y se concluyó que la estructura poblacional que presenta *T. cruzi* puede ser el resultado de dos o más eventos de hibridación no meiótica entre las diferentes cepas.

En el año del 2009, una reunión de expertos realizada en Buzios, Brasil, acordó un consenso para la clasificación de las cepas de *T. cruzi* en seis UDT (Tc-I a Tc-VI) teniendo en cuenta los estudios filogenéticos más recientes (Cuadro 2) (Zingales *et al.*, 2009,2012). Estas unidades se describieron como un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa y que son identificadas por medio de marcadores genéticos moleculares o inmunológicos comunes (Tibayrenc, 1988).

La inclusión de las diferentes cepas de *T. cruzi* en sus respectivas UDT se realizó mediante el empleo de marcadores que están disponibles en la forma de un triple ensayo (Lewis *et al.*, 2009) que consiste en una amplificación mediante PCR de secuencias de genes codificantes del ARNr 24 S $\alpha$ , ARNr 18S y mini-exon.

**Cuadro 2.** Nomenclatura de las seis UDT de *T. cruzi*.

UDT-Consenso 2009	Abreviatura	Equivalencia con nomenclaturas previas
<i>T. cruzi</i> I	Tc-I	<i>T. cruzi</i> I <sup>a,b</sup> y UDT I <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> II	Tc-II	<i>T. cruzi</i> II <sup>c</sup> y UDT IIb <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> III	Tc-III	Z3/Z1 ASAT <sup>d</sup> , Z3-A <sup>e</sup> , UDT IIC <sup>c</sup> y <i>T. cruzi</i> III <sup>f</sup>
<i>T. cruzi</i> IV	Tc-IV	Z3 <sup>d</sup> , Z3-B <sup>e</sup> y UDT IIa <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> V	Tc-V	Z3 Bolivia <sup>d</sup> , ADNr 1/2 <sup>g</sup> , Clonet 39 <sup>h</sup> y UDT IID <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> VI	Tc-VI	Z2 Paraguay <sup>i</sup> , Zimodemo B <sup>j</sup> y UDT IIe <sup>c</sup>

(a) Anónimo, 1999; (b) Falla *et al.*, 2009; (c) Brisse *et al.*, 2000; (d) Miles *et al.*, 1981; (e) Mendonça *et al.*, 2002; (f) Freitas *et al.*, 2005; (g) Souto *et al.*, 1996; (h) Tibayrenc *et al.*, 1991; (i) Chapman *et al.*, 1984; (j) Carneiro *et al.*, 1990. Tomado de: Zingales *et al.*, 2009.

La distribución de las UDT y sus características epidemiológicas son las siguientes:

**Tc-I:** Es el principal agente etiológico de la EC en los países del norte de Sudamérica, América Central y México, también se ha detectado en muestras clínicas de pacientes cardiopatas de Argentina (Burgos *et al.*, 2010; Zingales *et al.*, 2012). Este genotipo se encuentra en el vector triatomino de los ciclos silvestres y domésticos, además está asociado al ecotopo arbóreo con *Didelphis* (Yeo *et al.*, 2005). Existen 52 géneros de mamíferos que se encuentran naturalmente infectados con esta UDT entre los cuales resalta Marsupialia (Zingales *et al.*, 2012).

**Tc-II, Tc-V y Tc-VI:** Estas UDT presentan una restricción al ciclo doméstico de transmisión; Tc-II predomina en las regiones de Sudamérica y América Central pero su verdadera extensión aún no está clara (Zingales *et al.*, 2012) tiene implicaciones en casos de megasíndromes digestivos y cardiopatías (Lages-Silva *et al.*, 2006), el principal vector es

*Pastrongylus megistrus* (Sturm *et al.*, 2010). Las UDT Tc-V y Tc-VI son híbridas de Tc-II y Tc-III asociadas con la enfermedad chagásica en el sur y centro de Sudamérica (Zingales *et al.*, 2012).

**Tc-III:** Está asociado al ciclo selvático de Brasil y de las ciudades adyacentes. Se encuentra fuertemente asociado al ecotopo terrestre y al hospedero *Dasypus novemcinctus* (Yeo *et al.*, 2005). Asimismo, se ha encontrado asociado a la infección en perros en Argentina (Enriquez *et al.*, 2012).

**Tc-IV:** Es endémica de América del Norte, Amazonia y norte de Sudamérica. Se ha detectado en mapaches y primates en Estados Unidos y en *Rhodnius brethesi* de la región Amazónica, indicando un posible ecotopo arbóreo (Yeo *et al.*, 2005; Roellig *et al.*, 2008). Se ha encontrado evidencias que esta UDT podría estar dividida en dos linajes distintos, uno de América del Sur y otro de América del Norte (Lewis *et al.*, 2009).

Recientemente, se describió una combinación de genotipos de *T. cruzi* distintos a las seis UDT en murciélagos de Brasil y Panamá, denominado TcBat, es más cercano genéticamente a Tc-I pero claramente segregado del resto de las UDT. Se sugiere la hipótesis de un parásito ancestral de murciélagos que evolucionó para infectar a otros mamíferos incluyendo a los seres humanos (Marcili *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2012).

## **2.9 Genes utilizados para la filogenia y taxonomía de los tripanosomas**

La ausencia de criterios taxonómicos confiables ha llevado a innumerables errores de clasificación para este parásito. Debido a esto, existe un consenso que establece los criterios de clasificación en base a la filogenia molecular. A partir de los primeros análisis basados en secuencias de genes ribosómicos (Sogin *et al.*, 1986; Fernandes *et al.*, 1993) se han ido utilizando cada vez una gran variedad de marcadores para la construcción de la historia evolutiva de este organismo.

1.- Gen ribosómico. Las secuencias de este gen han sido ampliamente utilizadas para inferir relaciones filogenéticas entre los tripanosomatídeos así como entre ellos y otras familias

representativas del orden Kinetoplastida y el filo Euglenozoa. Los genes del ADNr de los tripanosomatídeos contienen una estructura compleja y característica, con uno de los más complejos padrones de moléculas maduras de ARN. La estructura del ADNr comprende una unidad de repetición compuesta por unidades de transcripción (cistrones ribosomales) y espaciadores intergénicos (IGS, por sus siglas en inglés “Intergenic Spacer”) que se repiten en tándem más de 100 veces en el genoma. Estos genes son procesados en una única unidad de transcripción o pre-ARNr, seguido por diversas etapas de procesamiento originando tres moléculas de ARN maduros: 18S (por sus siglas en inglés, “Small Subunit” o SSU), 5.8S y 24S (por sus siglas en inglés, “Large Subunit” o LSU) (Sogin *et al.*, 1986; Hernández *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1993).

Las secuencias de la SSU han sido las más utilizadas debido a sus características como: tamaño, la facilidad de obtención (amplificación por PCR) y la presencia de regiones variables flanqueadas por regiones conservadas que permiten alineamientos confiables. La subunidad SSU de los genes de ADNr de los tripanosomatídeos posee ocho regiones universalmente conservadas (U1-U8) y nueve regiones variables (V1-V9) (Hernandez *et al.*, 1990).

Las regiones del ITS (por sus siglas en inglés “Internal Transcribed Spacer”) del ADNr está compuesto: ITS1, 5.8S (altamente conservado) e ITS2. Los espaciadores ITS1 e ITS2 difieren inter e intraespecíficamente. Por lo tanto, son excelentes para el análisis de organismos filogenéticamente próximos, así como blancos para diagnóstico y marcadores taxonómicos. Los linajes de *T. cruzi* se pudieron diferenciar con el análisis de polimorfismo de restricción de secuencias de ITS ADNr, que permitió distinguir TcI, TcII y Z3 en Z3A y Z3B (Mendonça *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002).

2- Gen mitocondrial. El ADNk de los tripanosomatídeos representa ~20-25% del ADN total de la célula. Los maxicírculos corresponden al ADN mitocondrial de los eucariotes, codificando las proteínas necesarias para la actividad mitocondrial. Los minicírculos

codifican las moléculas de ARNs-guías utilizadas en la edición de los transcritos de maxicírculos (Simpson *et al.*, 1987).

La ausencia de recombinación y su alta tasa de evolución, la heterogeneidad entre sus genes convierten al ADN mitocondrial en un excelente marcador para la taxonomía y estudios filogenéticos (Meyer *et al.*, 1993).

El gen Cyt B (~1080 pb) se encuentra entre los más conservados y codifica una proteína transportadora de electrones (ferro-protoporfirina) presente en una única copia por maxicirculo (Westenberger *et al.*, 2006). Un estudio basado en este gen permitió separar *T. rangeli* de las especies del subgénero de *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T.c.marinkellei* y *T. dionisii*), confirmando la monofilia de *T. cruzi* y *T.c.marinkellei* segregando este último en dos grupos (Barnabé *et al.*, 2003).

3- Gen codificador de la enzima gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa del glicosoma (gGAPDH). Las especies de la familia de Trypanosomatidae presentan un organelo denominado glicosoma que contiene enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y el glicerol (vía glucolítica). La glucosa es la principal fuente de energía utilizada por los tripanosomas sanguíneos de los mamíferos (Hannaert *et al.*, 1992).

En los tripanosomas, se encontraron dos genes que codifican la enzima glicosómica (gGAPDH) semejante a las eucariotas en general y un gen que codifica una enzima citosólica (cGAPDH) relacionada con los genes bacterianos (Kendall *et al.*, 1990). Las divergencias de las secuencias de estos genes permitieron el diseño de cebadores para la amplificación específica de gGAPDH (Hamilton *et al.*, 2007).

Los genes de gGAPDH presentan dos copias prácticamente idénticas y como son codificadores de proteínas están sujetos a diferentes presiones selectivas con presentación de tasas de evolución diferentes comparadas con los genes ribosómicos. Estos genes son excelentes marcadores para estudios filogenéticos de los tripanosomatídeos debido a que permiten alineamientos confiables de secuencias de organismos genéticamente distantes (Hamilton *et al.*, 2007; Stevens, 2008).

### **3. Objetivos e Hipótesis**

#### **3.1 Objetivo general**

Caracterizar biológica y filogenéticamente aislados de *Trypanosoma cruzi* de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* de la localidad de Molas, Yucatán.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el comportamiento biológico de *Trypanosoma cruzi* a través de la detección de los niveles de parasitemia y mortalidad en ratones BALB/c infectados con los ocho aislados de *Didelphis virginiana*.
2. Determinar las diferencias y similitudes del comportamiento biológico de los ocho aislados de *Trypanosoma cruzi* de la población sinantrópica de *Didelphis virginiana* para explorar su relación con el arreglo filogenético.
3. Determinar el linaje de *Trypanosoma cruzi* de ocho aislados de *Didelphis virginiana* sinantrópicos mediante la técnica de PCR-RFLP.
4. Caracterizar filogenéticamente a *Trypanosoma cruzi* de ocho aislados de *Didelphis virginiana* sinantrópicos mediante los genes Cyt B, gGPADH y V7V8.

#### **3.3 Hipótesis**

Dado que las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* se transmiten selectivamente entre los ecotopos, los hospederos y los vectores se espera observar variabilidad en el comportamiento biológico y filogenético de aislados de este parásito provenientes de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* de la localidad de Molas, Yucatán.

#### 4. Referencias

- Acha, P., Szyfres, B., 2003. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3rd ed. Vol. III Parasitoses. Scientific and Technical Publication Pan American Health Organization. Washington, D.C. Pp. 23-24.
- Alves, C., Albuquerque-Cunha, J., Mello, C., García, E., Nogueira, N., González, M., 2007. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovilliar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*. 116: 44-52.
- Andrade, S.G., 1974. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev.Pat.Trop*. 65-121.
- Andrade, S.G., 1982. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 76 (1): 123-128.
- Anónimo, 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94: 429-432.
- Barnabé, C., Brisse, S., Tibayrenc, M., 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol*. 2 (3): 201-8.
- Barrera-Pérez, M.A., Rodríguez, M.E., Guzmán-Marin, E., Zavala-Velázquez, J., Dumonteil, E., 2001. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, México. *Revista Biomedica*. 12: 224-230.
- Bice De, Z.R., 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol*. 56: 663-70.

- Bosseno, M., Barnabé, C., Magallón, E., Lozano, F., 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J Clin Microbiol.* 40: 627-632.
- Bosseno, M., Barnabé, C., Sierra, M.J., Kengne, P., Guerrero, S., Lozano, F., et al., 2009. Wild ecotopes and food habitats of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 80: 988-991.
- Brener, Z., Costa, C.A., Chiari, C., 1976. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 18 (6): 450-455.
- Briones, M.R., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B., 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: 219-232.
- Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 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., Henriksson, J., Barnabe, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R., Buck, G.A., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2 (3): 173-83.
- Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 31 (11): 1218- 1226.

- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Bruses, B., Favalaro, L., Leguizamon, M.S., Lucero, R.H., Laguens, R., Levin, M.J., Favalaro, R., Schijman, A.G., 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 51 (5): 485-495.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5: 419-427.
- Carabarin, L. A., González, V. M., Rodríguez, M. O., Baylón., P. L., Rosales, E. J., Reyes, L. P., Arce, F. M., 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica.* 127: 126– 135.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., 1999. Filogenia dos triatomíneos. In: Carcavallo, R.U., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. (Eds.). Atlas dos Vectors da Doença de Chagas nas Américas. Vol. III. Fiocruz, Rio de Janeiro. Pp. 925-980.
- Carneiro, M., Chiari, E., Gonçalves, A.M., da Silva Pereira, A.A., Morel, C.M., Romanha, A.J., 1990. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* 47: 35-45.
- Castro, D., Seabra, S., García, E., De Souza, W., Azambuja, P., 2007. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental Parasitology.* 117: 201-207.
- Cavazzana, M Jr., Marcili, A., Lima, L., Da Silva, F.M., Junqueira, A.C.V., Veludo, H.H., Viola, L.B., Campaner, M., Nunes, V.L.B., Paiva, F., Coura, J.R., Camargo, E.P., Teixeira, M.M., 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 40 (3): 345– 355.

- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 1: 159-218.
- Chapman, M.D., Baggaley, R.C., Godfrey-Fausset, P.F., Malpas, T.J., White, G., Canese, J., Miles, M.A., 1984. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool.* 31 (3): 482–486.
- Coura, J.R., Pinto-Dias, J.C., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 31-40.
- Cruz-Reyes, A. y Pickering-Lopez, J.M., 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 345-354.
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N., Fernandes, O., 2002. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97 (6): 877-80.
- De Souza, W., Ulisses de Carvalho, T., Santos, E., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. Review Article. *International Journal of Cell Biology.* Article ID 295394. Pp. 18.
- Deane, M., Lenzi, H., Jansen, A., 1986. Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasitol Today.* 2: 146-147.
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C., 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.

- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H., Floeter-Winter, L.M., 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene*. 125 (1): 103-7.
- Dooijes, D., Chaves, I., Kieft, R., Dirks-Mulder, A., Martin, W., Borst, P., 2000. Base J originally found in Kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res.* 28: 3017–21.
- Dumonteil E. y Gourbière S. 2004. Predicción de la abundancia y tasa de infección de *Triatoma dimidiata*: un mapa de riesgo de transmisión natural de la enfermedad de Chagas en la península de Yucatán, México. *Rev Biomed.* 15: 221-231.
- Dumonteil, E., Tripet, F., Ramírez-Sierra, M., Payet, V., Lanzaro, G., Menu, F., 2007. Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 76: 930-937.
- Emmons, L.H. y Feer, F., 1997. Neotropical Rainforest Mammals, a field guide. 2da ed. Chicago: The University of Chicago Press.
- Enriquez, G.F., Cardinal, M.V., Orozco, M.M., Lanati, L., Schijman, A.G., Gürtler, R.E., 2012. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology.* 140 (3): 303-308.
- Espinoza, B., Vera-Cruz, J.M., González, H., Ortega, E., Hernández, R., 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica.* 70: 63-72.

- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G., 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110: 15-21.
- Fernandes, A.P., Nelson, K., Beverley, S.M., 1993. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 (24): 11608-12.
- Fernandes, O., Souto, R.P., Castro, J.A., Pereira, J.B., Fernandes, N.C., Junqueira, A.C., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Degraive, W., Zingales, B., Campbell, D.A., Coura, J.R., 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 58 (6): 807–811.
- Filardi, L.S., Brener, Z., 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 755-759.
- Freitas, J.M., Lages-Silva, E., Crema, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 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): 411-7.
- Gardner, A.L., 1973. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Special Publ Mus Texas Tech Univ.* 4: 1-81.
- Gaunt, M. W., Miles, M., 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95: 557-65.
- Gaunt, M.W., Yeo, M., et al., 2003. Mechanism of genetic Exchange in American trypanosomes. *Nature.* 421 (6926): 936-9.

- Gómez-Hernandez, C., Rezende-Oliveira, K., Nogueira, G.A., Rocha, L., Borges, H., Martínez-Ibarra, J.A., Trujillo, F., Lages-Silva, E., Ramírez, L.E., 2011. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44: 684-690.
- Gull, K., 2001. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol*. 31:443-52.
- Guzmán-Marin, E.S., Barrera-Pérez, M.A., Rodríguez-Felix, M.E., Zavala-Velázquez, J.E., 1992. Hábitos biológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán, México. *Rev Biomed*. 3: 125-131.
- Haag, J., O'Huigin, C., Overath, P., 1998. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol*. 91 (1): 37-49.
- Hamilton Jr, W.J., 1951. The food of the opossum in New York State. *J Wildlife Man*. 15: 258-264.
- Hamilton, P.B., Gibson, W.C., Stevens, J.R., 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein coding gene phylogenies. *Molecular phylogenetics and evolution*. 44 (1): 15-25.
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C., 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol*. 34 (12): 1393-404.
- Hannaert, V., Blaauw, M., Kohl, L., Allert, S., Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 1992. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 55 (1-2): 115-26.

- Hernández, L.F. y Mora, C.L., 2005. Historia natural de Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. Nucleo de Turismo. San José. Costa Rica.
- Hernández, R., Rios, P., Valdés, A.M., Piñero, D., 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 41 (2): 207-12.
- Hoare, C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Part 2 Systematic. Oxford: Blackwell Scientific Publications. Pp. 123-625.
- Hollar, L., Maslov, D.A., 1997. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasit.* 89: 295-9.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática., 2010. Censo Nacional de Población y Vivienda México. Disponible en:  
  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (consultado el 22 de febrero de 2014).
- Jansen, M.A., Rodrigues, A.L., 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: J. Telleria., M. Tibayrenc. (Eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. USA: Elsevier. Pp. 251-278.
- Kendall, G., Wilderspin, A.F., Ashall, F., Miles, M.A., Kelly, J.M., 1990. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the “hotspot” topogenic signal model. *EMBO J.* 9 (9): 2751-8.
- Lages-Silva, E., Ramírez, L.E., Pedrosa, A.L., Crema, E., da Cunha Galvão, L.M., Pena, S.D., Macedo, A.M., Chiari, E., 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.

- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 81 (6): 1041–1049.
- Lukes, J., Guilbride, D.L., Votypka, J., Zikova, A., Benne, R., Englund, P.T., 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell.* 1: 495–502.
- Macedo, A.M., Pena, S.D., 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 14 (3): 119-124.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A.C.V., Veludo, H.H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V.L.B., Teixeira, M.M., 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 136 (6): 641–655.
- Mendonça, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Coura, J.R., Zingales, B., Fernandes, O., 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* 124 (Pt 2): 177-84.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochchka, HN, Mommsen, GT: Biochemistry and molecular biology of fishes. Vol. 2.
- Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., Mauricio, I.L., 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* 136 (12): 1509-1528.

- Miles, M.A., Povoá, M.M., De Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J., Ketteridge, D.S., 1981. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 75 (5): 667-74.
- Miles, M.A., Souza, A., Povoá, M., Shaw, J.J., Lainson, R., Toyé, P.J., 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272: 819-821.
- Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G., 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 71: 217-225.
- Molyneux, D.H., 1991. Trypanosomes of bats. In "Parasitic Protozoa". Academic Press, London. 2<sup>a</sup> ed. Pp. 195-223.
- Montamat, E.E., Durand, S., Bocco, J.L., De Luca D' Oro, G.M., Blanco, A., 1999. Identification of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by kinetoplast DNA probes. *J Eukaryot Microbiol.* 46 (2): 155-159.
- Moreira, D., López-García, P., Vickerman, K., 2004. An update view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup : proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54 (Pt 5): 1861-75.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J., Simpson, L., 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.

- Mortara, R.A., Andreoli, W.K., Taniwaki, N.N., Fernandes, A.B., Silva, C.V., Fernandes, M.C., L'Abbate, C., Silva, S., 2005. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc*.77 (1): 77-94.
- Muñoz-Saravia, S. G., Sucre, S.B.H., Berlin, C.U., Haberland, A., Berlin, C.U., Wallukat, G., et al., 2012. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail. Rev.* 1: 45-64.
- NCBI- National Center for Biotechnology Information., 2012. Taxonomy browser. Disponible en :  
  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5693>  
(Consultado el 14 de septiembre de 2015).
- Nilsson, M.A., Arnason, U., Spencer, P.B.S., Janke, A., 2004. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. *Gene*. 340: 189-196.
- Noireau, F., Diosque, P., Jansen, A.M., 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its host. *Vet Res*. 40: 26.
- Nowak, R.M., 1991. Walker's Mammals of the World. 5th Ed .Volume 1. Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- OPS- Organización Panamericana de la Salud., 2007. En consulta técnica sobre diagnóstico y manejo de la enfermedad de Chagas, Instituto de cardiología " Dr. Ignacio Chavez" México, del 22 al 24 de Octubre, México, DF. Pp. 5-8.
- Parada-López, J., Hernández-Betancourt, S. F., Ruiz-Piña, H. A., Escobedo-Ortegón, F. J., Medina-Peralta, S.,Panti-May, J. A., 2013. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Didelphis virginiana* in Relation to Population Parameters and Variables Associated with Presence in Rural Community Dwellings in Yucatan, Mexico. *EcoHealth*. 10: 31-35.

- Pinto, C.M., Kalko, E.K., Cottontail, I., Wellinghausen, N., Cottontail, V.M., 2012. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 12 (6): 1328-1332.
- Pinto, J.C., 1984. Acute Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* .79 (Suppl): 85-91.
- Ponce, C., 2007. Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 (supl 1): 41-44.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B., 2003. A Vida dos Vertebrados. São Paulo: Atheneu.
- Ramírez-Sierra, M.J., Herrera-Aguilar, M., Gourbiere, S., Dumonteil, E., 2010. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine and International Health*.15: 77-86.
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteon, A., Dumonteil, E., 2012. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 1341-1343.
- Reidpath, D., Allotey, P., Pokhrel, S., 2011. Social sciences research in neglected tropical diseases 2: A bibliographic analysis. *Health Research Policy and Systems*. 9:1. doi: 10.1186/1478-4505-9-1.
- Roellig, D.M., Brown, E.L., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., 2008. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis*. 14 (7): 1123-1125.

- Ruiz-Piña, H., Cruz-Reyes, A., 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzildzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 5: 613-620.
- Santos, S.S., Cupolillo, E., Junqueira, A., Coura, J.R., Jansen, A., Sturm, N.R., et al., 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 Parasit*. 96 (8): 755-64.
- Schofield, C., 2000. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95 (4): 535-44.
- Schofield, C.J., 1988. The biosystematics of Triatominae. In: Biosystematics of Haematophagous Insects (M.W. Service, ed.). Special volume 37. Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press. Pp. 284-312.
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution and species groups within the *Triatominae*. *Acta Trop*. 100: 88-100.
- Schweigmann, N.J., Pietrokovsky, S., Conti, O., Escosteguy, M., Bottazzi, V., Solarz, N., et al., 1997. Infection of *Triatoma guasayana*, *Triatoma sordida* and *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* from a naturally infected opossum. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 92 (2): 151–152.
- Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol*. 41: 363-82.
- Simpson, A.G.B., Lukes, J., Roger, A.J., 2002. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol*. 19: 2071–83.

- Simpson, L., Sbicego, S., Aphasizhev, R., 2003. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: A complex business. *RNA*. 9: 265–76.
- Simpson, A.G.B., Stevens, J.R., Lukes, J., 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends parasitol*. 22: 168-74.
- Simpson, L., Theimann, O.H., Savill, N.J., Alfonzo, J.D., 2000. Evolution of RNA editing in trypanosomes mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA*. 97: 6986-93.
- Sogin, M.L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., Engberg, J., 1986. Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major Tetrahymena groups. *EMBO J*. 5 (13): 3625-30.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 83 (2): 141-152.
- Souto, R.P., Zingales, B., 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 62 (1): 45-52.
- Stevens, J.R., 2008. Kinetoplastid phylogenetics with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 15: 226-32.
- Stevens, J.R., Gibson, W.C., 1999a. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica*. 15 (4): 673-84.
- Stevens, J.R., Gibson, W.C., 1999b. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*. 15 (11): 432-7.
- Stevens, J., Noyes, H., Gibson, W., 1998. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 93 (5): 669-76.

- Stevens, J., Rambaut, A., 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 1 (2): 143-50.
- Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L., Panigrahi, A.K., 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci.* 30 (2): 97-105.
- Sturm, N.R., Campbell, D.A., 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115 (1-2): 35-43.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 33 (3): 205-214.
- Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, MT., Ceron, CR., 2006. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol.* 66: 703-8.
- Teixeira, L.A., Gomes, C., Lozzi, P.S., Hecht, M.M, Rosa, A.C., Monteiro, S.P., Bussaco, A.C., Nitz, N. y McManus, C., 2009. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cadernos de Saúde Pública.* 25 (1): 32-34.
- Tibayrenc, M., 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2 (1): 12.
- Tibayrenc, M, Ayala, F.J., 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution.* 42: 277-292.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today.* 7 (9): 228-232.

- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Carlier, Y., 1981. Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*: Implications taxonomiques. *C.R. Acad. SCI. Paris.* 293: 207- 209.
- Tibayrenc, M., Miles, M.A., 1983. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77 (1): 76–83.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 115-119.
- Urdaneta- Morales y S., Nironi, I., 1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossum. Isolation and experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91: 399-403.
- Uribarren, T., 2013. Enfermedad de chagas. Departamento de microbiología y parasitología. Recursos en parasitología. UNAM. Recuperado de:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>
- Vago, A.R., Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Andrade, L.O., Chiari, E., Galvão, L.M., Reis, D., Pereira, M.E., Simpson, A.J., Tostes, S., Pena, S.D., 1996. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol.* 149 (6): 2153-2159.
- Vickerman, K., 1976. The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen, W.H.R., Evans, D.A. (Eds). *Biology of the Kinetoplastida*. New York. *Academic Press*. Pp. 1-34.
- Vickerman, K., 1994. The evolutionary expansion of the Trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 24: 1317-31.

- Westenberger, S.J., Sturm, N.R., Campbell, D.A., 2006. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol.* 36 (3): 337-46.
- WHO- World Health Organization., 2002. Control of Chagas disease, Technical Report series No. 905. Geneva. Pp. 66.
- WHO- World Health Organization., 2013. Chaga's Disease (American Trypanosomiasis). WHO. Available from:  
  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (consultado el 10 de enero de 2014).
- Wright, A.D., Li, S., Feng, S., Martin, D.S., Lynn, D.H., 1999. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 99 (1): 69-76.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G.A., López, E., González, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., Rojas de Arias, Antonieta., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology.* 35: 225-233.
- Zeledón, R., Solano, G., Zúñiga, A., y Swartzwelder, J.C., 1973. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) III: Habitat and blood sources. *J Med Entomol.* 10: 363-370.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for

*Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (7): 1051-1054.

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

Zingales, B., Souto, R., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Campbell, D.A., Coura, J. R., Jansen, A., Fernandes, O., 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol*. 28: 105-112.

## 5. Artículo científico

En formato de revista Acta Tropica

### “Caracterización filogenética y biológica de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* de Yucatán, México”

Maria Alheli Cab-Romero<sup>a</sup>, Hugo Antonio Ruiz-Piña<sup>b</sup>, Enrique Alberto Reyes-Novelo<sup>b</sup>, Javier Escobedo-Ortegon<sup>b</sup>, Arlei Marcili<sup>c</sup>.

#### Resumen

*Trypanosoma cruzi* comprende poblaciones heterogéneas clasificadas dentro de seis Unidades Discretas de Tipificación con variaciones en su comportamiento biológico determinadas por los ciclos de transmisión selectiva entre los ecotopos, los hospederos y los vectores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar biológica y filogenéticamente los aislados de *T. cruzi* de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* de la localidad de Molas, Yucatán. Se seleccionaron 40 viviendas y se colocó una trampa Tomahawk Inc.® en cada patio. El muestreo se repitió mensualmente de enero a mayo del 2014 y se aplicó la técnica de marcaje-recaptura con una perforación de dos mm en la oreja. Se capturaron 66 individuos a los que se les extrajo sangre, se realizó la técnica de PCR y se detectaron 18 positivos, de los cuales se obtuvieron 8 aislados de *T. cruzi* en cultivos axénicos para el análisis filogenético con los genes SSU ADNr, gGAPDH y Cyt B con el fin de describir su relación entre ellos y clasificarlos dentro de las UDT. Por otro lado, el comportamiento biológico de estos aislados se observó mediante la inoculación de estos en ratones BALB/c para determinar la mortalidad y la parasitemia durante 30 días. Los resultados confirmaron una asociación de *D. virginiana* con Tc-I y los ratones BALB/c infectados presentaron dos diferentes patrones de comportamiento, el primer patrón mostró una baja parasitemia sin mortalidad y el segundo mostró una parasitemia mayor con un 100% de mortalidad entre los días 13 y 14 post-infección. De esta manera, se comprueba que *D. virginiana* representa un reservorio de *T. cruzi* en Yucatán y que a pesar de que los diferentes aislados del parásito pertenecen a Tc-I, la virulencia diferenciada del parásito muestra que estas cepas podrían estar moduladas por las diferentes poblaciones del insecto vector, los animales silvestres o peridomésticos.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Didelphis virginiana*, UDT, Filogenia, Parasitemia Molas, Yucatán, México

---

<sup>a</sup> Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, AP 4-116, Mérida, Yucatán, México.

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Apartado Postal 1247-A, C.P. 97240, Mérida, Yucatán, México.

<sup>c</sup> Universidad de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Cidade Universitaria, CEP 05508270, São Paulo, SP, Brazil.

## 1. Introducción

En 1909, Carlos Chagas identificó a *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), transmitido al hombre por insectos hematófagos infectados, pertenecientes a la subfamilia Triatominae. Se estableció el carácter zoonótico con el nombre de tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas (EC) con una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, actualmente se considera una patología parasitaria que ocasiona estragos en la salud pública y la economía en América Latina (Chagas, 1909; WHO, 2002; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012 ).

Los análisis filogenéticos de *T. cruzi* basados en una serie de marcadores nucleares y mitocondriales indican que el género es monofilético (Lake *et al.*, 1988; Stevens *et al.*, 2001). La hipótesis de monofilia sugiere que un parásito ancestral originó a los tripanosomas de los mamíferos de África, América y Australia. Las primeras formas de *T. cruzi* se asociaron con los marsupiales de la familia Didelphidae hace 80 millones de años (Briones *et al.*, 1999; Buscaglia *et al.*, 2003). Con el paso del tiempo, *T. cruzi* se adaptó a los diferentes mamíferos y se inició los hábitos hematófagos de los vectores (Schofield *et al.*, 2009) para desarrollar el ciclo digenético en donde actuaron diferentes presiones selectivas y dio lugar a una extensa variedad de poblaciones de este parásito (Jansen *et al.*, 2010).

Durante años se realizaron estudios de análisis de variantes electroforéticas de isoenzimas (Miles *et al.*, 1977, 1978) y otras técnicas moleculares para finalmente identificar seis unidades discretas de tipificación (UDT) de *T. cruzi* genéticamente relacionadas entre si, nombradas como Tc-I a Tc-VI las cuales están presentes en diferentes ecotopos que determinan la ecología evolutiva del parásito en una región y asocia caracteres biológicos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Zingales *et al.*, 2009, 2012).

Todas las UDT se consideran infectivas para el ser humano, algunos estudios sugieren que Tc-II, Tc-III y Tc-IV están asociadas con ambientes domésticos y con pacientes con manifestaciones crónicas de la enfermedad, Tc-III y Tc-IV con ambientes silvestres y Tc-I con ambos ambientes (Miles *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2005; Zingales *et al.*, 2012). En Paraguay, se han identificado las seis UDT circulando en triatominos, en casos humanos, en animales silvestres y domésticos (Acosta *et al.*, 2013). En Colombia se ha reportado Tc-I de

forma predominante y en una baja proporción Tc-II, Tc-III, Tc-IV y Tc-VI (Burgos *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2008).

En México, se han realizado desde 1998 estudios mediante diversas técnicas sobre la caracterización molecular y biológica de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos, mamíferos hospederos y casos humanos, los cuales revelan la presencia de *T. cruzi* grupo I principalmente en el sureste de México y *T. cruzi* II en el centro de este país con variaciones en el comportamiento biológico en modelos murinos a nivel de parasitemia, mortalidad y tropismo (Espinoza *et al.*, 1998; Barrera-Pérez *et al.*, 2001; Bosseno *et al.*, 2002; Bosseno *et al.*, 2009; Gomez-Hernandez *et al.*, 2011; Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

Sin embargo, los estudios al respecto son muy escasos pero han revelado que las poblaciones de *T. cruzi* circulan entre los hospederos mamíferos, vectores y ecotopos de una manera selectiva dependiendo de la asociación (parásito-hospedero). A partir de esto, el presente estudio se realizó en la localidad de Molas, Yucatán en donde la cercanía de las especies silvestres, animales domésticos y triatomíneos pueden presentar un riesgo para la transmisión de *T. cruzi* al ser humano.

En donde, *Didelphis virginiana* (*D. virginiana*) se convirtió en el modelo ideal debido a su comportamiento sinantrópico, el papel como hospedero que mantiene a este parásito en el peridomicilio rural (Ruiz-Piña *et al.*, 2002; Parada-López *et al.*, 2013), su gran capacidad de adaptación y su desplazamiento entre diferentes ecotopos.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar biológica y filogenéticamente los aislados de *T. cruzi* que circulan en la población sinantrópica de *D. virginiana* de la localidad rural de Molas, Yucatán, México.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Descripción del área de estudio**

El estudio se realizó en la localidad de Molas (20° 48'00''N y 89° 38'00''O), ubicada a 16 km al sur de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Esta localidad cuenta con una población de 2,014 habitantes y se encuentra dentro de los límites de la Reserva Ecológica Cuxtal (INEGI, 2010). Presenta un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano ( $AW_0$ ) con una temperatura media anual de más de 26°C (García, 1973). Circundando la zona conurbana predominan fragmentos de vegetación secundaria en diferentes etapas de sucesión compuestos por especies nativas de selva baja caducifolia (*Ceiba aesculifolia* Bombaceae, *Bursera Simaruba* Burceraceae y *Talisia Olivaeformis* Sapindaceae, entre otras) y pequeños fragmentos con características de ésta selva cuya altura oscila de 6 a 15 m (Flores y Espejel, 1994).

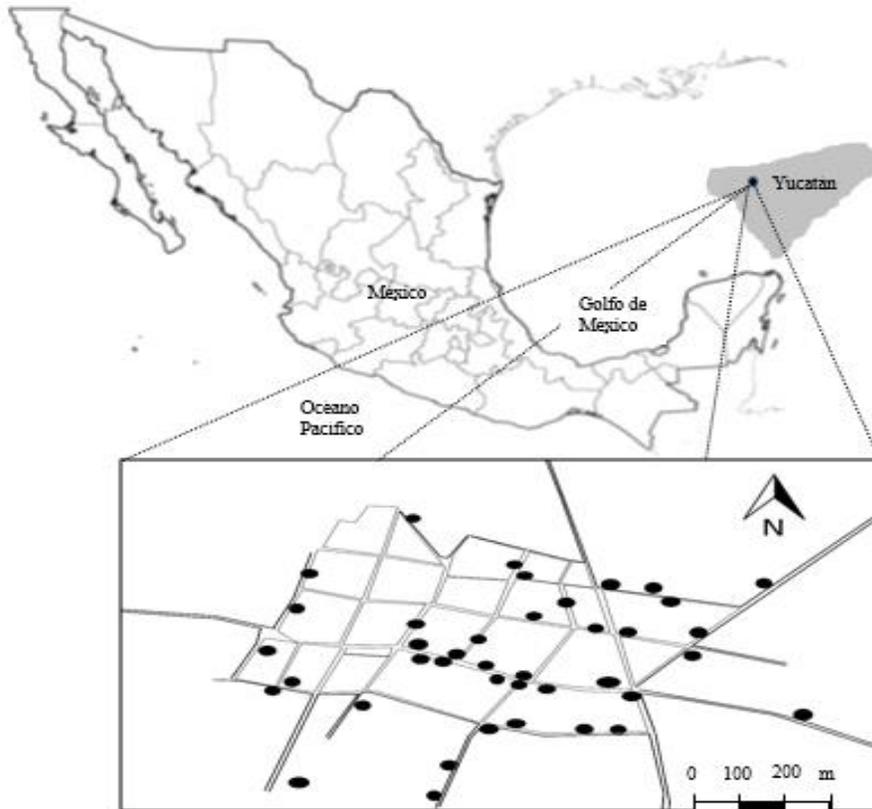
### **2.2 Diseño del estudio y captura de *Didelphis virginiana***

El muestreo se realizó en un total de 40 viviendas de la localidad de Molas (Fig.1) y se colocó una trampa tipo National Tomahawk Inc.® en cada patio utilizando como cebo fruta de temporada durante tres días consecutivos de cada mes en el período enero a mayo del 2014. Las trampas fueron marcadas al momento de su colocación con una etiqueta en la parte superior con los siguientes datos: fecha, número de individuo capturado y el número de vivienda asignada.

Todos los individuos capturados fueron transportados al Laboratorio de Zoonosis del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” y se utilizó un esquema de captura-marcaje-recaptura, el cual consiste en una perforación de dos mm en la oreja de cada individuo para no repetir la obtención de muestra sanguínea en los mismos animales (Begon, 1979).

Los animales se confinaron en un espacio exclusivo con techo, ventilación e iluminación adecuada para disminuir al mínimo el estrés. Se les alimentó de manera continua y se les

proporcionó agua mientras se encontraban en cautiverio para evitar deshidratación (Gannon *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de la localidad de Molas, Yucatán, México. Los puntos señalan las viviendas muestreadas. Modificado de Pantí (2011).

### 2.3 Obtención de muestras

De cada individuo se obtuvieron de 1 a 2 ml de sangre mediante punción de la vena caudal. La muestra se dividió en dos partes, una parte de la sangre se transfirió a un Microtainer® con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y la otra se utilizó para sembrar en tubos de cultivo con medio bifásico, los cuales contenían BAB (Blood Agar Base) sangre + LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964). Las muestras fueron marcadas con la clave asignada del laboratorio y fecha. Los hemocultivos fueron incubados a 28°C y examinados a partir del día 21 con revisiones semanales durante 3 meses.

Al momento de retirar la aguja para la toma de muestra, la sangre que emanó fue transferida a un tubo capilar con heparina que fue sellado con plastilina para el estudio de microconcentración para identificar tripanosomas sanguíneos de las muestras, el método consiste en concentrar los parásitos en tubos capilares heparinizados por centrifugación a 11,000 rpm durante dos minutos (Vega *et al.*, 2005). Después de la centrifugación se observó la capa flogística y con el uso de un lápiz con punta de diamante se hizo el corte del capilar y el contenido de la capa flogística fue depositado en un portaobjetos para su posterior observación al microscopio con el objetivo de 40X.

Posteriormente, los animales diagnosticados como positivos fueron sacrificados de acuerdo al Reglamento de la Asociación Protectora de Animales del Municipio de Mérida (1955) mediante una sobredosis de PISABENTAL® (Pentobarbital sódico 6.3%) a razón de 40 mg/kg PCV (Peso Corporal Vivo). Los animales negativos fueron marcados y liberados después de tres a seis días, a una distancia de 500 m afuera de la localidad de Molas.

#### **2.4 Reacción de cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en *Didelphis virginiana***

Todas las muestras sanguíneas recolectadas con el Microtainer® fueron analizadas mediante la prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el diagnóstico de *T. cruzi*. De estas muestras se extrajo el ADN utilizando un estuche de purificación (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La detección de *T. cruzi* se realizó usando los siguientes cebadores : TcZ1 (5´- CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3´) y TcZ2 (5´- CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGC-3´) los cuales amplifican 188 pb (Moser *et al.*, 1989).

Para cada prueba se utilizaron 2 µl de ADN genómico, agregando el master mix (GoTaq®Green Master Mix, PROMEGA®): 10 µl de buffer al 2x (MgCl<sub>2</sub> al 1.5 µM, 200µM dATP, 200µM dGTP, 200 µM dCTP, 200µM dTTA, 0.3 µl (0.5 UI) de ADN polimerasa), 10 picomoles de cada cebador y finalmente 6.7 µl de agua bidestilada estéril. De esta manera, se obtuvo un total 20 µl de mezcla.

Como control positivo se utilizaron 2 µl de ADN de *T. cruzi* (10 a 20ng) de la cepa H5 y 18 µl de master mix, obteniendo un volumen final de 20 µl; como control negativo se utilizó únicamente el master mix (20 µl).

Posteriormente, las muestras se colocaron en un termociclador modelo SelectCycler® (Select Bio® Products) con las siguientes condiciones: desnaturalización de 10 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 20 s a 94°C; 10 s a 57°C; 30 s a 72°C, seguidos de un paso de extensión de 7 min a 72°C y un enfriamiento final a 10°C. La mitad del producto amplificado (10µl) de la muestra, se colocó en un gel de agarosa al 1.5 % en TBE 1X (1l: 54 gr de tris- base, 27.5 gr de ácido bórico, 800 ml de H<sub>2</sub>O y 20 ml de EDTA 0.5M, pH 8.0) y bromuro de etidio (5 µg/ml), y se dejó correr 30 min a 100V en una cámara de electroforesis horizontal. Por último, el gel fue colocado en un transiluminador-UV para observar el resultado, documentando la imagen mediante el programa EDAS290 (Kodak®, Rochester, NY).

## **2.5 Crecimiento y manutención de los cultivos axénicos**

De los hemocultivos se aislaron tripanosomas que fueron transferidos a frascos de cultivos alimentados con medio LIT (20% SFB) y cultivados mediante la metodología de Camargo (1964) hasta obtener una gran cantidad de epimastigotes, posteriormente se realizó lo siguiente:

- a) Criopreservación: se colocaron 45 ml de cada cultivo en tubos falcon y se centrifugaron a 3200 rpm a 22°C por 10 min para obtener la masa de parásitos. Después se adicionaron 1.8 ml del medio de congelamiento que contiene : 20 ml de LIT (con 10% SFB y dextrosa), 5% SFB (Suero Fetal Bovino) adicional y 20% DMSO (dimetil sulfóxido), en cada criotubo con una pipeta pasteur para obtener triplicados de cada aislado. Finalmente los aislados se mantuvieron congelados en N<sub>2</sub> líquido en la Colección Brasileña de Tripanosomátidos (CBT) del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal/Universidad de São Paulo, Brasil. De esta manera, nuestros ocho aislados fueron nombrados: CBT 171-173 y CBT 183-187.

b) Obtención del ADN genómico de los tripanosomas: Los tripanosomas obtenidos de los ocho cultivos previamente mencionados se les realizó la extracción del ADN mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 2001). El ADN precipitado fue lavado con etanol a 70%, las pastillas fueron secadas a 56°C por 15 minutos y se resuspendieron en TE (10 mM de Tris- HCl, Ph 7.4., 1 mM de EDTA pH 8.0). Las muestras de ADN fueron cuantificadas en un Thermo Scientific® NanoDrop 2000/2000c.

## **2.6 Reacción de PCR para amplificar un fragmento de ADN con los genes ITS, Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH**

Para poder caracterizar filogenéticamente a *T. cruzi* de los ocho aislados de *D. virginiana* el primer paso fue la realización de las reacciones de PCR del ADN extraído con fenol-cloroformo, en donde se utilizó la siguiente mezcla: 100 ng de ADN genómico, 100 ng de cada cebador, 200 mM de cada dNTP, 5 µl de tampon (200 mM Tris- HCl, Ph 8.4, 500 mM KCl y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2.5 u de *Taq* ADN y agua bidestilada estéril. La descripción de cada cebador utilizado se puede observar en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Cebadores para amplificar un segmento de ADN para caracterizar molecularmente los aislados de *T. cruzi*

<b>Cebadores para el análisis filogenético</b>	<b>Tamaño de amplicón esperado</b>	<b>Referencias</b>
V7-V8 SSU ADNr 609F (5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3') 706R (5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3')	900 pb	Maia da Silva <i>et al.</i> , 2004
gGAPDH GA Try F (5' CGC GGA TCC ASG GYC TYM TCG GBA MKG AGAT 3') GA Try R (5' CGC GGA TCC CBA CVG CYT TSG CSG GRC CAGT 3')	600 pb	Hannaert <i>et al.</i> , 1998
Cyt B P18 (5' GAC AGG ATT GAG AAG GGA GAG AG 3') P20 (5' GAC AGG ATT GAG AAG GGA GAG AG 3')	870 pb	Brisse <i>et al.</i> , 2003
<b>Cebador para determinar el linaje de <i>T. cruzi</i></b>		
ITS 1 ADNr T-ITSF (5' GAT ATT TCT TCA ATA GAG GAA GC 3') 5.8SR (5' GGA AGG CAA GTC ATC CAT C 3')	1 kb	Marcili <i>et al.</i> , 2009a

## **2.7 Determinación del linaje mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de sitios de restricción de ADN amplificados por PCR**

Para poder determinar el linaje de *T. cruzi* de los ocho aislados de *D. virginiana* se realizó el corte con la enzima FastDigest *Bsh1236I* (Thermo Scientific®) a 37°C durante 10 minutos en los amplicones de la región del cistrón ribosómico ITS1 (cuadro 3). Después, fue separada por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y posterior tinción con SYBR® Safe in DMSO (10,000 x) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por último se observó en un Transiluminador UV y se documentó usando el programa Alphasampler-HP 2000® (ProteinSimple). El padrón de fragmentos producidos para el linaje Tc-I es de 250 pb y para el linaje Tc-II es de 350 pb.

## **2.8 Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN (Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH) previamente amplificados por PCR**

Los productos de la PCR (Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH) fueron purificados utilizando el producto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste en Exonuclease I (*Exo I*) y Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para digerir el exceso de los cebadores provenientes de la PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante e inmediatamente las muestras fueron colocadas en el termociclador a temperaturas de 37°C por 15 min y 80°C durante otros 15 min.

Después de la purificación, los nucleótidos estaban listos para ser utilizados en la reacción de secuenciamiento con el kit comercial BigDye TM Terminator (Perkin Elmer®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas en un secuenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Perkin Elmer®). Las reacciones fueron sometidas a 30 ciclos de: 15 seg a 96°C, 15 seg a 50°C, 4 min a 60°C, con un ciclo inicial de 1 min a 96°C.

## **2.9 Alineamiento de las secuencias obtenidas**

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con diversas secuencias disponibles en el banco de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Las secuencias de Cyt B y gGAPDH obtenidas

en este estudio y las obtenidas con el GenBank fueron alineadas con el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) alterando los parámetros relativos a la inserción de “indels” (Peso de inserción =1, Extensión=1); asimismo, las secuencias del gen V7V8 así como los dos anteriores fueron ajustados en el programa GenDoc.2.6.01 (Nicholas *et al.*, 1997).

## **2.10 Análisis filogenético**

Con las secuencias completas de los genes de Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH fueron refinadas y alineadas para realizar los árboles filogenéticos mediante los métodos de máxima parsimonia (MP) y análisis bayesiano (B). Los árboles de MP se construyeron usando el programa PAUP v.40b10 (Swofford, 1998) a través de la búsqueda heurística con 100 réplicas de adición aleatoria de las terminales después de un intercambio de ramas (“RAS-TBR Branch-Breaking”). Los análisis de soporte por “Bootstrap” se realizaron con 100 réplicas con los mismos parámetros empleados en la búsqueda.

Los análisis bayesianos fueron hechos mediante el programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Empleándose 500,000 generaciones usando GTR (General Time Reversible) como modelo de sustitución y 4 categorías de rango más la proporción de sitios invariantes. La construcción del dendograma final se desarrolló sólo con los diagramas obtenidos en las últimas 75 réplicas. Para la verificación de soporte de ramas en los análisis bayesianos fueron utilizados los valores de probabilidad a posteriori obtenidos con el programa Mr.Bayes.

## **2.11 Comportamiento biológico de los cultivos de *Trypanosoma cruzi***

### **2.11.1 Animales experimentales**

Para determinar el comportamiento biológico de los ocho aislados de *T. cruzi* se realizó un estudio en donde se utilizaron 24 hembras de ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, provenientes de la misma madre, libres de infección por *T. cruzi* y se dividieron en grupos de 3 ratones por cada lote. Los ratones se adquirieron del Bioterio del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva de Salud Animal/Universidad de São Paulo. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la USP.

### **2.11.2 Infección en los animales de experimentación**

La infección en los ratones BALB/c se realizó con el inóculo obtenido de los cultivos axénicos y se cuantificó la dosis con la ayuda de una cámara de Neubauer. Cada ratón BALB/c recibió un inóculo  $10^7$  tripomastigotes metacíclicos por vía intraperitoneal.

Los ratones se examinaron cada tercer día a partir del día quinto al 30 post- infección para detectar la presencia de tripomastigotes sanguíneos. Para ello se desinfectó la punta de la cola de cada ratón y se obtuvo la sangre que fue depositada en un capilar con heparina, posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante tres min para la observación bajo el microscopio.

Se elaboró el registro de parasitemia y mortalidad durante los 30 días post –infección que duró el experimento y los animales negativos al examen de microhematocrito (MH) fueron nuevamente muestreados por medio de punción cardiaca para la realización de hemocultivos.

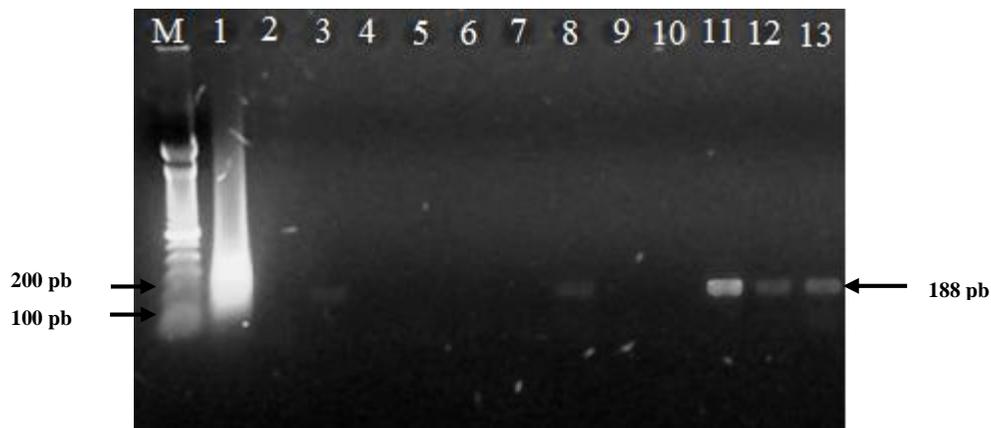
### **2.11.3 Análisis**

Se aplicó el software Graphpad Prism® versión 6.0 con un intervalo de confianza de 95% para realizar la representación gráfica de la mortalidad de los ratones BALB/c inoculados con *T. cruzi*.

## **3. Resultados**

### **3.1 Diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en *Didelphis virginiana***

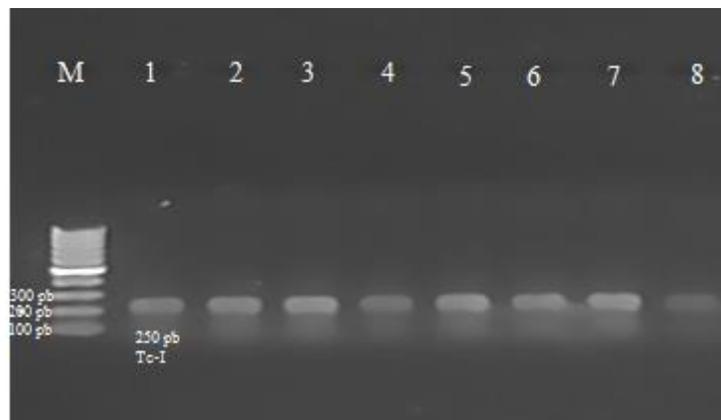
Se capturaron 66 individuos en la localidad de Molas, Yucatán, de los cuales 13/66 fueron positivos al examen de microconcentración y en la técnica de PCR convencional se detectaron la presencia de 18/66 individuos que amplificaron una región del ADN nuclear de 188 pb como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que amplifican la banda de 188 pb para el gen Tcz1-Tcz2 a partir de muestras sanguíneas de *Didelphis virginiana* capturados en Molas, Yucatán. Carriles: M.- Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, Ladder 1.0 µg/1µl); 1.- Control positivo cepa H5; 2.- Control negativo; 4-7 y 9 y 10 muestras negativas a *T. cruzi*; 3, 8 y 11-13 muestras positivas a *T. cruzi*.

### 3.2 Genotipificación de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR-RFLP de los espaciadores intergénicos transcritos (ITS)

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR correspondientes al gen ITS1 ADN<sub>r</sub> reveló en el gel de agarosa mediante la técnica de PCR-RFLP con la digestión de la enzima *Bsh* 1236I la presencia de las bandas de restricción de 250 pb que corresponden a *T. cruzi* I. En la figura 3, se observa la banda de 250 pb que caracteriza a este grupo.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con SYBR que amplifica la banda de restricción de 250 pb obtenidos por PCR-RFLP de los amplificados con el gen ITS1 ADN<sub>r</sub> después de la digestión con la enzima *Bsh* 1236I a partir de muestras sanguíneas de *D. virginiana* capturadas en Molas, Yucatán. Carriles: M.- Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, Ladder 1.0 µg/1µl); 1-8 linaje Tc-I.

### **3.3 Caracterización filogenética de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de *Didelphis virginiana* de la localidad de Molas, Yucatán.**

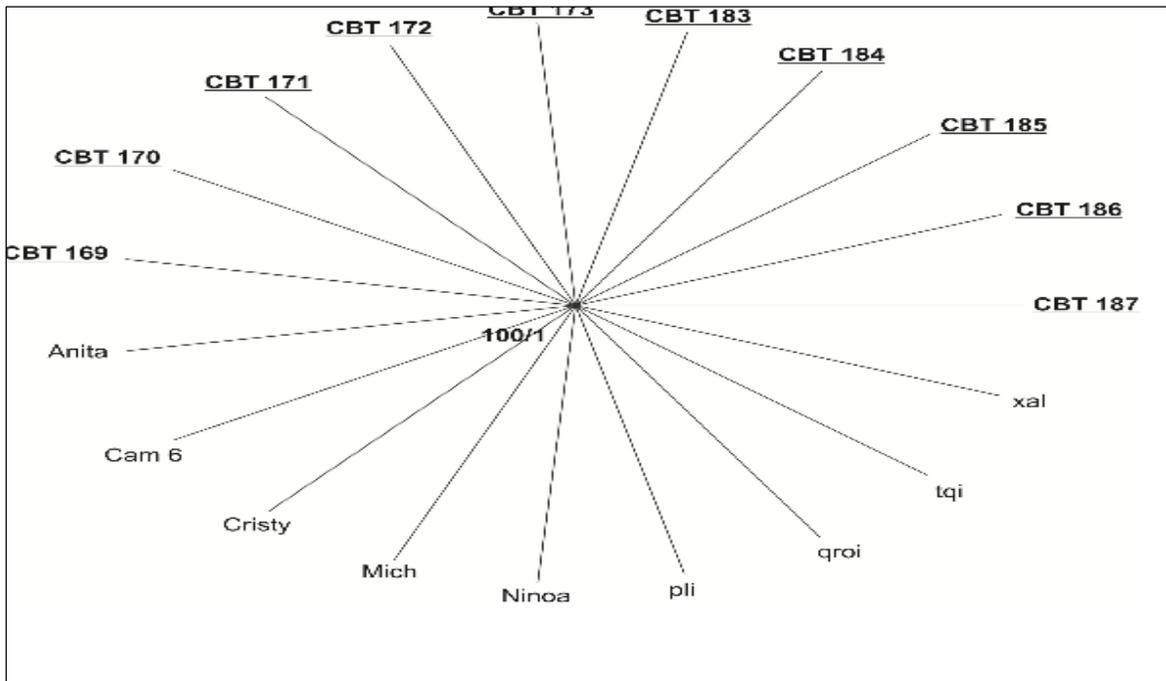
Para evaluar el proceso de la caracterización filogenética a partir de la metodología aplicada a los ocho aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos durante el estudio se realizó lo siguiente:

Las secuencias del gen Cyt B (Fig. 4) al compararlas con las cepas de referencia del GenBank provenientes de aislados mexicanos de diferentes estados (*Triatoma dimidiata*, *Homo sapiens*, *Dipetalogaster máxima*, *Triatoma pallidipennis*) (Zumaya- Estrada *et al.*, 2012) no mostraron diferencias entre ellos (100 % Bootstrap y 1% probabilidad posterior).

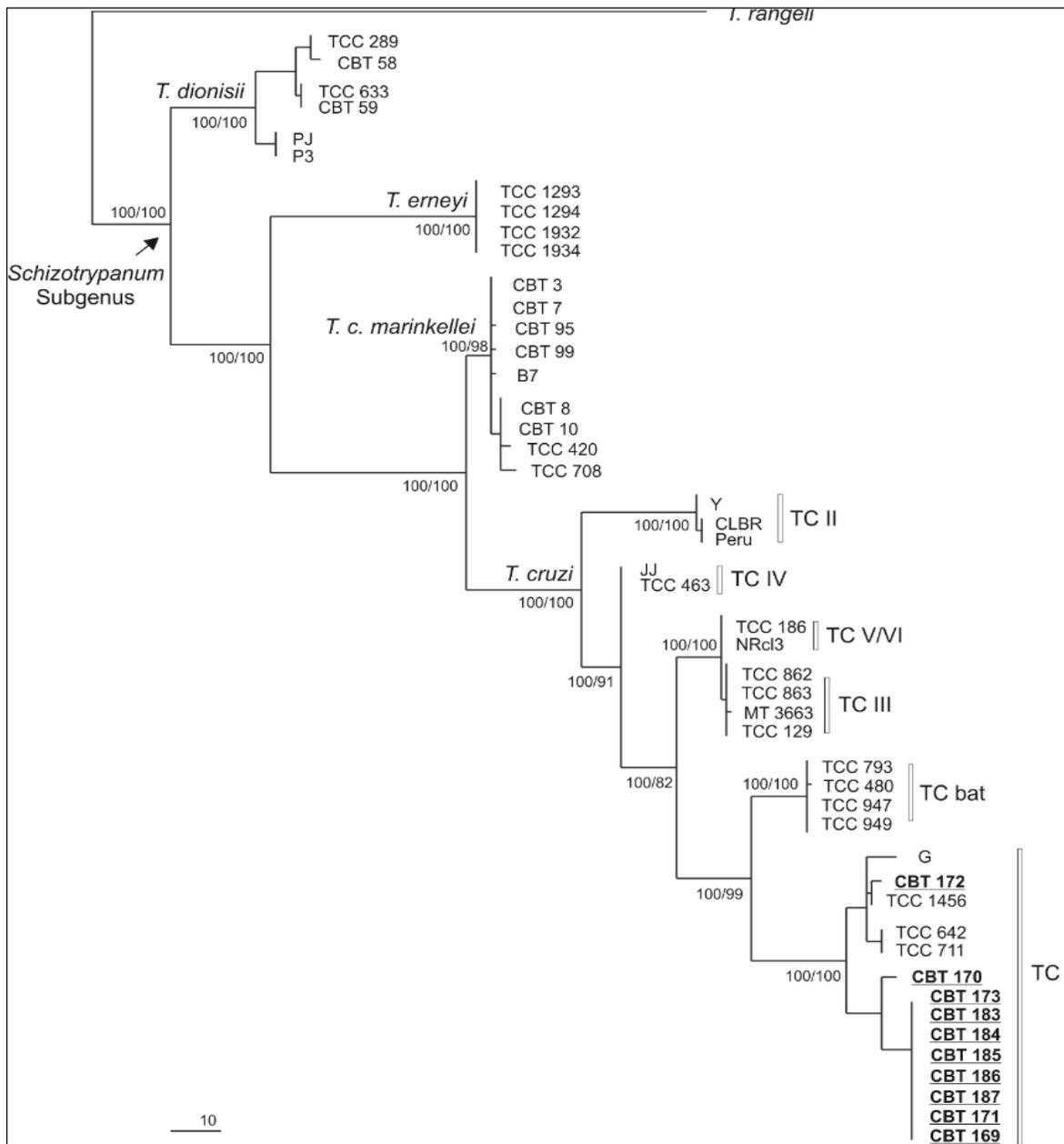
Las secuencias de la región V7-V8 de la SSU ADNr alineadas se compararon con las cepas de referencia del GenBank (Fig. 5), las secuencias estudiadas se agruparon como monofilético afirmando de esta forma que se tratan de aislados de Tc-I pero los segregó en dos grupos (100% Bootstrap y 100% probabilidad posterior).

Por último, las secuencias de la región gGAPDH (Fig. 6) se compararon con las cepas de referencia del GenBank, se obtuvo un comportamiento más polimórfico y dividió los aislados en tres grupos pero correspondiendo a Tc-I (100% Bootstrap y 100% probabilidad posterior).

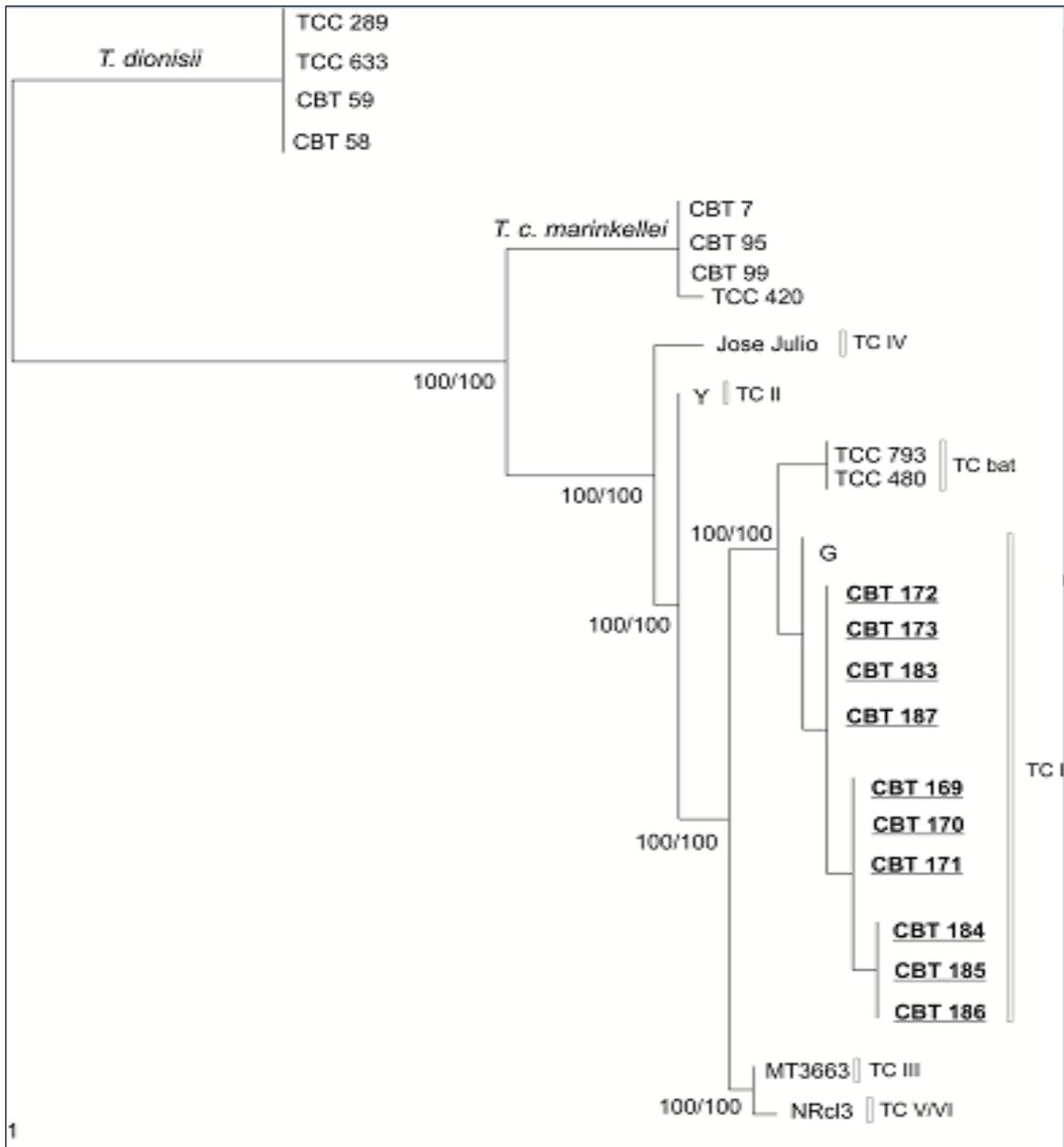
Por lo tanto, las topologías de los árboles coincidieron para ambos métodos (Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana), los cuales tienen un soporte estadístico fuerte que los corrobora e indica que los aislados del estudio pertenecen a Tc-I.



**Figura 4.** Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen Cyt B con 19 secuencias de tripanosomátidos del GenBank. Los números de los nodos son los valores de apoyo para las principales ramas (Bootstrap/probabilidad posterior; 100 y 75 réplicas respectivamente). Los aislados del estudio fueron subrayados.



**Figura 5.** Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen SSU ADNr con 48 secuencias de tripanosomátidos del GenBank con *T. rangeli* como grupo externo. Los números de los nodos son los valores de apoyo para las principales ramas (Boostrap/probabilidad posterior; 100 y 75 réplicas respectivamente). Los aislados del estudio fueron subrayados.



**Figura 6.** Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia e inferencia bayesiana del gen gGAPDH con 20 secuencias de tripanosomátidos del GenBank con *T. dionisii* como grupo externo. Los números de los nodos son los valores de apoyo para las principales ramas (Bootstrap/probabilidad posterior; 100 y 75 réplicas respectivamente). Los aislados del estudio fueron subrayados.

### **3.4 Caracterización biológica en modelo murino infectados de los aislados de *Trypanosoma cruzi* de *Didelphis virginiana***

El comportamiento biológico de los ocho aislados de *T. cruzi* fue estudiado por medio de infección experimental en ratones BALB/c. Todos los ratones inoculados (100%) adquirieron la infección y se determinó la parasitemia a partir del quinto día post-infección. Se detectó el inicio de la parasitemia entre los días 5 y 14 post-infección para los ocho aislados de *T. cruzi* y duró 26 días para CBT 172, 23 días para CBT 171 y CBT 183, 20 días para CBT 185, 14 días para CBT 173 y CBT 187 y 11 días para CBT 186 y CBT 184 (Cuadro 4).

Los picos máximos registrados de parasitemia son de las cepas CBT 186 y CBT 184 con una cantidad de 1000 parásitos circulando en sangre por medio de MH en el día 11 post-infección; la parasitemia del aislado CBT 183 alcanzó dos picos máximos, el primero fue de 500 parásitos en circulación sanguínea en el día 14 post-infección y el segundo de 1000 parásitos en el día 20 post-infección. Las demás cepas no tuvieron una gran variación entre ellas durante los 30 días post-infección alcanzando números bajos.

La tasa de mortalidad también mostró diferencias entre los aislados, como muestra el cuadro 4. Los ratones infectados con el aislado CBT 184, 3/3 (100%) murieron entre los días 13 y 14 post-infección así como el aislado CBT 186, 3/3 (100%). Los demás aislados no presentaron mortalidades durante el tiempo de estudio.

**Cuadro 4.** Comportamiento de los aislados de *T. cruzi* en ratones BALB/c inoculados experimentalmente con tripomastigotes metacíclicos procedentes de la localidad de Molas, Yucatán, México.

Grupo/dosis	N° de ratones infectados	Inicio de parasitemia (día <i>pi</i> )	Máximo número de tripomastigotes/día de muestreo (MH)	Día <i>pi</i> de muerte del ratón
<b>CBT 171/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	14	10/14 día	∅
	R2	11	10/11 día	∅
	R3	17	1/23 día	∅
<b>CBT 172/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	11	2/11 día	∅
	R2	23	1/23 día	∅
	R3	11	5/11 día	∅
<b>CBT 173/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	14	5/14 día	∅
	R2	11	3/día	∅
	R3	-	-	∅
<b>CBT 183/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	5	100/ 20 día	∅
	R2	5	1000/20 día	∅
	R3	-	-	∅
<b>CBT 184/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	11	1000/11 día	13 día
	R2	11	1000/11 día	14 día
	R3	11	50/11 día	14 día
<b>CBT 185/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	-	-	∅
	R2	-	-	∅
	R3	14	2/20 día	∅
<b>CBT 186/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	8	1000/11 día	13 día
	R2	8	1000/11 día	13 día
	R3	8	1000/11 día	14 día
<b>CBT 187/ 10<sup>7</sup> TM</b>	R1	8	1/8 día	∅
	R2	-	-	∅
	R3	8	1/8 día	∅

CBT: Colección Brasileña de Tripanosomátidos, TM: tripomastigotes metacíclicos, R: número de ratón de cada replica del lote, *Pi*: post-infección, MH: método de microhematocrito, (-): sin cambio aparente, ∅: sin mortalidad durante los 30 días del experimento.

## 4. Discusión

### 4.1 La importancia entre los aislados de *Trypanosoma cruzi* y relaciones genéticas entre ellos

Los análisis filogenéticos de *T. cruzi* de los ocho aislados de *D. virginiana* que se obtuvieron de la localidad de Molas, en los cuales se usaron los genes: Cyt B, SSU V7V8 (ADNr) y gGAPDH, mostraron que el 100% de sus secuencias se agruparon en Tc-I.

Se observó que el gen más polimórfico fue el gGAPDH que segregó los aislados en tres grupos dejando a CBT 171 por un lado y el gen SSU los dividió en dos grupos dejando un único taxón separado, el CBT 172. Una explicación de esta segregación, se demuestra en varios trabajos una alta variabilidad genética dentro de Tc-I con varios marcadores moleculares y revelan que Tc-I no es homogéneo como se creía, presentándose subdivisiones que van desde 2 a 5 haplotipos como se ha sugerido, aunque esta aseveración es muy precipitada debido a que se requiere más investigación molecular al respecto (Cura *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2009; Marcili *et al.*, 2009b; Spotorno *et al.*, 2008).

Sin embargo, existe la posibilidad de la existencia de un linaje críptico de *T. cruzi* que explique el comportamiento biológico de nuestros aislados que circulan en la localidad de Molas, en un intento de conciliar nuestros datos genéticos segregados con diferentes topologías con la biología (Guhl *et al.*, 2011; León *et al.*, 2015).

Por otro lado, los resultados sobre el genotipo de *T. cruzi* que se encuentra presente en la población sinantrópica de *D. virginiana* de la localidad de Molas, es concordante con los reportes realizados desde 1992 de las cepas yucatecas tanto de vectores y animales silvestres como de humanos (Zavala-Castro *et al.*, 1992; López-Olmos *et al.*, 1998) así como de otras regiones de México (López-Olmos *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002; Ruiz- Sánchez *et al.*, 2005; Sánchez-Guillén *et al.*, 2006; Gómez-Hernández *et al.*, 2011) reportando que el linaje I (antigua clasificación) se encuentra circulando en diferentes ciclos de transmisión de este parásito.

Sin embargo, Bosseno et al. (2002) obtuvo 56 aislados (*T. longipennis*, *T. pallidipennis*, Humanos, *T. barberi*, *D. virginiana*, *T. phyllostoma*, *T. picturata*, *D. marsupialis* y *Philander oposum*) de nueve estados de la República Mexicana (Colima, Guanajuato, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Zacatecas) de acuerdo con los análisis que se reportaron, todos los aislados correspondían al linaje I excepto el 2.4% de estos, debido a que se agrupó con el linaje II; que correspondían a los aislados ubicados en Veracruz de *D. virginiana* y *Philander oposum*. En 2012, se realizó el primer reporte en México detectándose diferentes UDT circulando en los mismos ciclos de transmisión, este estudio se llevó a cabo mediante capturas de 300 triatomíneos (*T. dimidiata*) en domicilios y peridomicilios de las localidades de Orizaba y Córdoba en Veracruz, encontrándose una infección natural de *T. cruzi* del 13.7% (41/300) y se detectó por varios métodos moleculares las siguientes UDT: Tc-I: 27% (9/33), Tc-II: 12%(4/33), Tc-III: 15% (5/33), Tc-IV: 18% (6/33) y Tc-V: 27% (9/33), indicando una clara diversidad con altas frecuencias de las diferentes UDT de *T. cruzi* a pesar del número limitado de muestras (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

A pesar de los diferentes estudios que demuestran diversas UDT distribuidos en México, la predominancia de Tc-I en nuestro estudio puede deberse a que se ha demostrado que los vectores pueden actuar como filtros biológicos, seleccionando las poblaciones del parásito a transmitir mediante mecanismos específicos como factores inmunes intestinales, enzimas digestivas y factores líticos entre otros (García y Azambuja, 1991; Cuervo *et al.*, 2002) de esta manera, determina la etiología de las cepas de *T. cruzi* involucradas en el ciclo de transmisión (Patterson *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay que mencionar que nuestros resultados son compatibles con los estudios de Roelling et al. (2009a,b) los cuales demostraron la asociación genotipo - hospedero en el sureste de Estados Unidos con dos especies de marsupiales mediante infección experimental (*Monodelphis domestica* y *D. virginiana*) en donde se señaló la asociación de *Didelphis* con la UDT I y su resistencia al linaje II (antigua clasificación), sugiriendo que la dinámica de la infección de las diferentes cepas de *T. cruzi* puede variar considerablemente en diferentes hospederos de vida silvestre.

Nuestros datos también son congruentes con los estudios realizados en América Central y Sudamérica en donde se detectó una asociación entre el genotipo y el hospedero (*Didelphis* spp.) con los ecotopos (Yeo *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2007). Además un estudio reciente realizado por López-Cancino *et al.* (2015) en la Reserva de la biosfera de Calakmul, Campeche, demostró que la prevalencia de Tc-I disminuye de acuerdo al incremento de los hábitats modificados (Silvestre-Ecoton-Doméstico), sin embargo, los hospederos silvestres en especial *D. virginiana* se beneficia de la degradación de los hábitats con una infección predominante de Tc-I (hábitats silvestres y domésticos) señalando que la transmisión de *T. cruzi* depende de la disponibilidad de los hospederos dentro de un paisaje permeable. Por lo tanto, estos datos sugieren que *D. virginiana* posee una gran adaptación a Tc-I.

#### **4.2 Comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi***

En este estudio, se examinó el comportamiento biológico *in vivo* de los ocho aislados de *D. virginiana* que poseen un alto grado de infectividad debido a que el 100% de los ratones inoculados se infectaron.

Se distinguieron dos diferentes patrones de comportamiento biológico *in vivo*, de los cuales seis aislados mostraron bajas parasitemias en los ratones BALB/c (CBT 187, CBT 173, CBT 183, CBT 171, CBT 172, y CBT 185), mientras que dos (CBT 186 y CBT 184) tuvieron una mortalidad del 100% a los 14 días post-infección con el inicio de parasitemia entre los 8 y 11 días post-infección; contrastando nuestros resultados con el estudio realizado en Yucatán por Barrera-Pérez *et al.* (2001) en ratones experimentales (tres cepas de humanos) donde se determinó una tasa de mortalidad del 8.33% y 50% entre los días 24 y 30 post-infección.

Estas diferencias entre los dos trabajos se pueden atribuir a los cambios de virulencia del parásito a través de los múltiples contactos de los vectores y hospederos presentes del área, así como el bajo inóculo utilizado y el manejo de los aislados en sucesivos pases de ratón a ratón para conservar las cepas, disminuyendo con ésto su capacidad de virulencia por lo que

se presentaron resultados no compatibles con nuestro estudio (Brener *et al.*, 1985; Melo *et al.*, 1978; Rey, 1991; Villalta y Kierszenbaum, 1987).

Cabe mencionar que las tasas de mortalidad de nuestro estudio son más altas comparadas con el reporte previo de Gomez *et al.* (2011) en la región del Occidente de México, donde se registró del 3.3% al 53.3% de mortalidad en ratones infectados (cepas de humanos y triatomas).

Por otro lado, Monteon *et al.* (2009) reportó la presencia de parasitemia en ratones infectados (cepas de humanos y triatomas) al día 10 post-infección sin mortalidad durante los 30 días de estudio, similar a nuestros resultados; estas diferencias pueden estar relacionadas con la modulación de la virulencia de *T. cruzi* asociado a los vectores, ya que el lumen intestinal del triatomino es un ambiente de multiplicación y diferenciación del parásito y sus interacciones con el entorno pueden variar sus propiedades biológicas (Magalhaes *et al.*, 1996; Lauria-Pires *et al.*, 1997). Esta aseveración es apoyada por Garcia *et al.* (2010) sugiriendo que las interacciones entre el parásito y los componentes del lumen intestinal (enzimas digestivas, hemolisinas, aglutininas y componentes antimicrobianos) pueden reducir la virulencia de las cepas a medida que pasa por los vectores.

Es importante señalar, que el comportamiento de ciertas cepas esta influenciado por el vector predominante de cada área endémica. En este caso, *T. dimidiata* es el vector más importante de la península de Yucatán y se ha demostrado por medio de dos grupos experimentales (Triatoma- Ratón y Ratón-Ratón) la modulación de la virulencia de algunas cepas aisladas de mamíferos (Guzmán-Marin *et al.*, 2012). De igual forma, se sugiere la posibilidad que la sangre aviar en los vectores puede modular las características patogénicas del parásito demostrado por Calderon-Arguedas *et al.* (2003) con dos tipos de sangre (aviar y murina) registrando una supervivencia mayor en ratones vinculados con la sangre aviar (comportamiento refractario) en comparación con la sangre murina.

Como un dato interesante, en el presente estudio se observó que los aislados con alta virulencia (CBT 184 y 186) manifestaron en los ratones BALB/c signos clínicos compatibles con ascitis, esplenomegalia y problemas neurodegenerativos (observación personal)

desencadenando la muerte de estos grupos, mientras que los grupos restantes sólo se observó ascitis durante toda la fase experimental y sobrevivieron a la infección. Sin embargo, se requiere de un estudio específico para determinar el tropismo de los aislados.

Por lo tanto, los diferentes patrones de comportamiento de los aislados se puede deber a la relación que existe entre la frecuencia del pasaje de *T. cruzi* entre el hospedero y el vector, condicionando de esta forma su virulencia.

### **4.3 Importancia de *Trypanosoma cruzi* para la salud pública**

Las zoonosis generalmente están asociadas a los cambios en las relaciones hospedero-parásito, ocasionadas principalmente por las modificaciones en los focos naturales que resultan de las actividades humanas así como los fenómenos naturales (Patz *et al.*, 2000).

En México, los estudios acerca de los hospederos silvestres son escasos, un ejemplo es *D. virginiana* que es considerado un portador natural de una gran diversidad de agentes zoonóticos transmitidos por vectores hacia otros mamíferos incluso al ser humano (Barr, 1963).

El presente estudio ha demostrado que los aislados de *T. cruzi* de *D. virginiana* de la localidad de Molas pertenecen a la UDT I con dos diferentes patrones de comportamiento biológico *in vivo* entre los cuales uno posee mayor virulencia que el otro.

En el estado de Yucatán tan solo 42 casos humanos han sido documentados con cardiomiopatía chagásica de 1970-1985 (Barrera-Pérez *et al.*, 1990; Zavala-Castro *et al.*, 1995) característica predominante de la UDT I. Estudios recientes han demostrado que en Yucatán, la seroprevalencia varía entre 1% en áreas urbanas y hasta 4% en localidades rurales (Sosa-Estani *et al.*, 2008; Gamboa-León *et al.*, 2014). En este estudio, cabe la posibilidad que el flujo genético de las poblaciones de *T. cruzi* es el mismo que *D. virginiana* introduce desde el ecotopo silvestre al doméstico debido a su comportamiento sinantrópico para establecer refugios dentro y fuera de las viviendas humanas forzando a los vectores (*T. dimidiata*) a la adaptación domiciliar, donde estos encuentran cobijo y suficiente alimento

tanto de sangre humana como de animales domésticos, como consecuencia, la población humana podrían estar expuestas a *T. cruzi* y desarrollar la EC.

Los ciclos de transmisión de *T. cruzi* en esta área se encuentran enlazados principalmente por *D. virginiana*, se ha documentado en los Estados Unidos los patrones de movimiento de esta especie (Wiseman *et al.*, 1950; Long *et al.*, 1968; Allen *et al.*, 1985; Gehrt *et al.*, 1997), lo cual indica que este marsupial tiene un comportamiento hogareño y la distancia mínima que recorren son de 400 m indicando que estos mamíferos permanecen en constante movimiento; el único trabajo realizado en México en la localidad Dzidzilché (Ruiz-Piña *et al.*, 2002) durante un periodo de dos años sobre el desplazamiento, se registró que las hembras recorrieron menos distancia que los machos y las hembras con crías infectadas de *T. cruzi* recorrieron aún menos distancia que las no infectadas con una frecuencia de infección del 55% (Ruiz-Piña *et al.*, 2002; Parada-López *et al.*, 2011). Con esto, se observa que *D. virginiana* tiene altas frecuencias de infección por *T. cruzi*, lo que convierte a esta especie en un potencial reservorio de importancia en salud pública de la región.

A pesar de estos factores de exposición la erradicación del parásito es casi imposible y el riesgo de transmisión a las personas es latente, por esta razón es necesario entender la biología de la dinámica de transmisión de este parásito en conjunto con su estructura poblacional para realizar medidas de control y de prevención en las zonas endémicas. La importancia de este trabajo radica en que relaciona ambos aspectos (Biológico y genético) que se circunscriben dentro de la compleja dinámica de *T. cruzi*, sin embargo, hay que realizar más estudios que incluyan las bases ecológicas y biológicas de *T. cruzi* en los estudios genéticos. Proponemos realizar un estudio de tipificación de multilocus de secuencias (MLST) con diferentes técnicas bioinformáticas para establecer, manejar, analizar y unir la totalidad de los datos biológicos que nos ayude a comprender la estructura poblacional de *T. cruzi* de una manera más precisa en conjunto con un modelo murino para vincular el comportamiento biológico.

## 5. Conclusiones

- 1.- El comportamiento biológico de los aislados de *T. cruzi* inoculados en los ratones BALB/c presentó un índice de mortalidad alto en los individuos con mayor parasitemia y un menor tiempo de vida post-infección en comparación con los individuos de menor parasitemia.
- 2.- El comportamiento biológico de *T. cruzi* está asociado al genotipo Tc-I pero debido a la virulencia diferenciada del parásito podría estar condicionada entre la frecuencia del pasaje entre el hospedero y el vector.
- 3.- La prueba de PCR-RFLP con los cebadores de la región del cistron ribosómico ITS1 presento en todas las muestras de *T. cruzi* de la población sinantrópica de *D. virginiana* la existencia del linaje de *T. cruzi* tipo I.
- 4.- Los dos tipos de análisis (Máxima parsimonia e inferencia bayesiana) mediante los genes Cyt B, SSU V7V8 y gGAPDH de los aislados de *T. cruzi* de la población sinantrópica de *D. virginiana* presentaron topologias similares con un alto soporte estadístico que indica que los aislados pertenecen a Tc-I.
- 5.- De esta manera entonces, la adecuada tipificación genotípica de los aislados de *T. cruzi* que se utilizaron en la infección experimental con ratones BALB/c en donde se observó una virulencia diferenciada del párasito, nos permite avanzar en el conocimiento sobre la interacción que existe entre *T. cruzi* y el hospedero; que son finalmente resultado de una compleja relación entre las características genéticas y biológicas de los aislados, que pueden estar moduladas por el habitat, el insecto vector y los hospederos.

## **Agradecimientos**

Al apoyo brindado por CONACYT. Al proyecto Monitoreo, vigilancia e intervención de patógenos zoonóticos y ETVS en un área rural del estado de Yucatán. Financiado por Promep 103.5/13/5270.

## 6. Referencias

- Acosta, N., López, E., 2013. Cepas de *Trypanosoma cruzi* en el Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 11 (2): 78-89.
- Allen, C. H., Marchinton, R.L., Lentz, W.M., 1985. Movement, habitat use and denning of opossums in the Georgia Piedmont. *Am Midl Nat.* 113: 408-412.
- Barr, T.R., 1963. Infectious diseases in the opossum: A review. *J Wildlife Man.* 27 (1): 53-71.
- Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, M.E., Guzmán-Marín, E., Zavala-Velázquez, J., 1990. Enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán. Revisión de casos clínicos en fase aguda de 1970-1989. *Revista biomédica.* Vol. 1. N° 4. 185-195.
- Barrera-Pérez, M.A., Rodríguez, M.E., Guzmán-Marín, E., Zavala-Velázquez, J., Dumonteil, E., 2001. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, México. *Revista Biomedica.* 12: 224-230.
- Begon, M., 1979. Investigating Animal Abundance: Capture-recapture for Biologists, University Park Press. Baltimore. Pp. 97.
- Bosseno, M., Barnabé, C., Magallón, E., Lozano, F., 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J Clin Microbiol.* 40: 627-632.
- Bosseno, M., Barnabé, C., Sierra, M.J., Kengne, P., Guerrero, S., Lozano, F., et al., 2009. Wild ecotopes and food habitats of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 80: 988-991.
- Brener, Z., 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* Vol. 18. Supplement 1. Pp. 1-8.

- Briones, M.R., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B., 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: 219-232.
- Brisse, S; Henriksson, J; Barnabé, C; Douzery, E.J; Berkens, D; Serrano, M; De Carvalho, R., Buck, G. A., Dujardin, J., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic and hybridization in *Trypanosoma cruzi* base don nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution.* 173-183.
- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Bruses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M.S., Lucero, R.H., Laguens, R., Levin, M.J., Favaloro, R., Schijman, A.G., 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 51 (5): 485-495.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5: 419-427.
- Calderón- Arguedas, O., Chinchilla, M., García, F., Vargas, M., 2003. Variaciones biológicas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) asociadas con la ingestión de diferentes tipos de sangre por el vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitol Latinoam.* 58: 3-10.
- Camargo, E., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. *Rev. inst. med. trop. Sao Paulo.* 6: 93.
- 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 homen. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 1: 159-218.

- Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N. y Fernandes, O., 2002. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97 (6): 877–880.
- Cura, C.I., Mejía-Jaramillo, A.M., Duffy, T., Burgos, J.M., Rodriguero, M., Cardinal, M.V., Kjos, S., Gurgel-Gonçalves, R., Blanchet, D., de Pablos, L.M., Tomasini, N., da Silva, A., Russomando, G., Cuba, C.A., Aznar, C., Abate, T., Levin, M.J., Osuna, A., Gürtler, R.E., Diosque, P., Solari, A., Triana-Chávez, O., Schijman, A.G., 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: 1599–1607.
- Espinoza, B., Vera-Cruz, J.M., González, H., Ortega, E., Hernández, R., 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica*. 70: 63-72.
- Flores, J.S. y Espejel, I., 1994. Tipos de vegetación de la Península de Yucatán. *Etnof yuc*. Fascículo tres. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Gamboa-León, R., Ramirez-Gonzalez, C., Pacheco-Tucuch, F.S., O’Shea, M., Rosecrans, K., Pippitt, J., et al., 2014. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among mothers and children in rural Mayan communities and associated reproductive outcomes. *Am J Trop Med Hyg*. 91 (2): 348–53.
- Gannon, W.L., Sikes, R.S. y The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists., 2007. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mamm*. 88 (3): 809-823.
- García, E., 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. Segunda edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp. 26.

- García, E. y Azambuja, P., 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology today*. (7) 9: 240-244.
- García, E.S., Genta, F.A., De Azambuja, P., Schaub, G.A., 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*. Vol. 26. N°10. Pp. 499-505.
- Gehrt, S.D., Clark, D.E., Fritzell, E.K., 1997. Population dynamics and ecology of Virginia opossum in southern Texas. *Southwest Nat.* 42 (2): 170-176.
- Gómez-Hernandez, C., Rezende-Oliveira, K., Nogueira, G.A., Rocha, L., Borges, H., Martínez-Ibarra, J.A., Trujillo, F., Lages-Silva, E., Ramírez, L.E., 2011. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44: 684-690.
- Guhl, F., Ramírez, J.D., 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivisión?. *Acta Trop.* 119 (1): 1-4.
- Guzmán-Marin, E., Jimenez-Coello, M., Puerto-Solis, M., Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., 2012. Influence of *Triatoma dimidiata* in Modulating the Virulence of *Trypanosoma cruzi* Mexican Strains. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Doi: 10.1155/2012/328091.
- Hannaert, V., Oppeerdoes, F.R., Michels, A.M.P., 1998. Comparison and Evolutionary Analysis of the Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Different Kinetoplastida. *J Mol Evol.* 47: 728–738.
- Herrera, C., Guhl, F., Falla, A., Fajardo, A., Montilla, M., 2009. Genetic variability and phylogenetic relations hips within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on miniexon gene sequences. *J Parasitol Res.* ID 897364.

- INEGI- Instituto Nacional de Estadística y Geografía., 2010. Demografía y Población. Disponible en: [http:// www.inegi.org.mx/](http://www.inegi.org.mx/) (Consultado el 25 de septiembre de 2013).
- Jansen, M.A., Rodrigues, A.L., 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: J. Telleria., M. Tibayrenc. (Eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. USA: Elsevier. Pp. 251-278.
- Lauria-Pires, L., Santana, J.M., Tavares, F.S., Teixeira, A.R., 1997. Diversity of *T. cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I-Behavioral characterization in vitro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30: 187-92.
- Lake, J.A., De La Cruz, V.F., Ferreira, P.C.G., Morel, C., Simpson, L., 1988. Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Nat Acad Sci USA.* 85: 4779-4783.
- León, C.M., Hernández, C., Montilla, M., Ramírez, J.D., 2015. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1-7.
- Long, C.A., Copes, F.A., 1968. Note on the rate of dispersion of the opossum in Wisconsin. *Am Midl Nat.* 80: 283-284.
- López-Cancino, S.A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Félix, H.K., Ibarra-Cerdeña, C.N., Izeta-Alberdi, A., Pech-May, A., Mazariegos-Hidalgo, C.J., Valdez-Tah, A., Ramsey, J.M., 2015. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica.* 151: 58-72.
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Pinero, D., Ortega, E., Hernandez, R., Espinoza, B., 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69: 239-254.
- Magalhaes, J.B., Andrade, S.G., Sherlock, I., 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behaviour after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (Biological and biochemical patterns). *Rev Ins Med Trop Sao Paulo.* 38: 23-8.

- Maia da Silva, F; Noyes, H; Campaner, M., Junqueira, A.C; Coura, J.R; Añez, N; Shaw, J.J; Stevens, J.R; Texeira, M.M.G., 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 129: 549-561.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, Jr., M., Junqueira, A.C.V., Veludo, H.H., Maia da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V.L.B., Texeira, M.M.G., 2009a. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome band Histone H2B genes and genotyping based on ITS 1 rDNA. *Parasitology*. 136: 641-655.
- Marcili, A., Lima, L., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., 2009b. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: New hosts, association with terrestrial ecotopes and spatial clustering. *Inf Gen Evol*. 9: 1265-1274.
- Melo, R.C., Brener, Z., 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *Journal of Parasitology*. Vol. 64. N° 3. Pp. 475– 482.
- Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., Mauricio, I.L., 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 136 (12): 1509-1528.
- Miles, M.A., Souza, A., Povoá, M., Shaw, J.J., Lainson, R., Toyé, P.J., 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 272: 819-821.

- Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G., 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 71: 217-225.
- Monteon, V., Godínez, S., Cruz-Zetina, G., Balmes, J., López, R., Hernández, Ó., 2009. Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metacicloogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. *Rev Biomed.* 20: 206-214.
- Moser, D; Kirchhoff, L.V; Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 1477-1482.
- Muñoz-Saravia, S. G., Sucre, S. B. H., Berlin, C.-U., Haberland, A., Berlin, C.U., Wallukat, G., et al., 2012. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail. Rev.* 1: 45-64.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation.
- O'Connor, O., Bosseno, M.F., Barnabé, C., Douzery, E.J.P., Benière, S.F., 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infection Genetics and Evolution.* 7: 587–593.
- Panti, M.J., resultados no publicados., 2011. Pequeños roedores como huéspedes de *Trypanosoma cruzi* en viviendas de la localidad de Molas, Yucatán, México. Tesis. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp.53
- Parada-López, J., Hernández-Betancourt, S. F., Ruiz-Piña, H. A., Escobedo-Ortegón, F. J., Medina-Peralta, S.,Panti-May, J. A., 2013. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Didelphis*

- virginiana* in Relation to Population Parameters and Variables Associated with Presence in Rural Community Dwellings in Yucatan, Mexico. *EcoHealth*. 10: 31-35.
- Patterson, S.J., Guhl, F., 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: J. Telleria., M. Tibayrenc. (Eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. USA: Elsevier. Pp. 94.
- Patz, J. A., Graczyk, T. K., Geller, N., Vittor, A. Y., 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*. 30: 1395-1405.
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteon, A., Dumonteil, E., 2012. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 1341-1343.
- Reglamento De la Asociación Protectora de Animales Del Municipio de Mérida., 1955. Disponible en : [www.yucatan.gob.mx](http://www.yucatan.gob.mx) (consultado el 10 de enero de 2014).
- Rey, Luis., 1991. *Trypanosoma cruzi* e Doença de chagas: A Doença. Guanabara Koogan S.A. Parasitología. II edição. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 141.
- Roellig, D.M., Ellis, A.E., Yabsley, M.J., 2009a. Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Int J. Parasitol*. 39: 1603-1610.
- Roellig, D.M., McMillan, K., Ellis, A.E., Vandenberg, J.L., Champagne, D.E., Yabsley, M.J., 2009b. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol*. 1-8.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19. n° 19. 1572-1574.

- Ruiz-Piña, H., Cruz-Reyes, A., 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzildzilché, Yucatán, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 5: 613-620.
- Ruiz- Sánchez, R., De León, P., Matta, V., Reyes, P., Monteón, V., 2005. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 281-83.
- Sambrook, J., Rusell, D.W., 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. CSHL Press. New York.
- Sánchez –Guillén, M. del C., Bernabé, C., Tibayrenc, M., Zavala-Castro, J., Totolhua, J.L., Méndez-López, J., González, M.E., Torres-Rasgado, E., López-Colombo, A., Pérez-Fuentes, R., 2006. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101: 585-590.
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution and species groups within the *Triatominae*. *Acta Trop.* 100: 88-100.
- Sosa- Estani, S., Gamboa-Leon, M.R., Del Cid-Lemus, J., Althabe, F., Alger, J., Almendares, O., et al., 2008. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras and México. *Am J Trop Med Hyg.* 79 (5): 755-9.
- Spotorno, A, E., Córdova, L., Solari, A., 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infect Genet Evol.* 8: 898-900.
- Stevens, J., Rambaut, A., 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 1 (2): 143-50.

- Swofford, D. L., 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), v. 4.0. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. et al., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.
- Vega, C.S., Náquira, V.C., 2005. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N°00. Lima, Perú.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F., 1987. Insect-borne and culture-derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. 36. No. 3. Pp. 529– 532.
- WHO- World Health Organization., 2002. Control of Chagas disease. Technical Report series No. 905. Geneva. Pp. 66.
- Wiseman, G.L., Hendrickson, G.O., 1950. Notes on the life history and ecology of the opossum in Southeast Iowa. *J Mamm.* 31 (3): 331-336.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., López, E., González, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., Rojas de Arias, A., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology.* 35: 225-233.
- Zafra, G., Mantilla, J.C., Valadares, H.M., Macedo, A.M., Gonzalez, C.I., 2008. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol. Res.* 103: 731–734.

- Zavala-Castro, J.E., Gutiérrez-Flota, H., Barrera-Pérez, M.A., Bolio-Solis, A.J., Zavala-Velazquez, J.E., 1995. Chronic Chagas cardiomyopathy detected in patients at the Regional General Hospital O´Horan, Merida, Yucatan, Mexico. *Archivos del Instituto de Cardiología de México*. Vol. 65. N°6. 546-550.
- Zavala-Castro, J.E., Velasco- Castrejon, O., Hernandez, R., 1992. Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am J Trop Med Hyg*. 47: 201-9.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (7): 1051-1054.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 12 (2): 240-253.
- Zumaya-Estrada, F.A., Messenger, L.A., Lopez-Ordonez, T., Lewis, M.D., Flores-Lopez,, C.A., Martínez-Ibarra, A.J., Pennington, P.M., Cordon-Rosales, C., Carrasco, H.V., Segovia, M., Miles, M.A., Llewellyn, M.S., 2012. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasites & Vectors*. 5: 226.

Correspondencia:

**MVZ. Maria Alheli Cab Romero**

Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,

Universidad Autónoma de Yucatán.

Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, AP 4-116,

Mérida, Yucatán, México.

E-mail: macr\_55555@hotmail.com

Tel: (999) 2597050