



**Universidad Autónoma del Estado de Morelos**



**Facultad de Medicina**

**Secretaría de Investigación**

**Coordinación General de Posgrado**

---

**Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de  
*Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos.**

**Tesis para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular**

**Presenta:**

**Biol. Itzel Amairani Gutiérrez Reyna**

**Director de Tesis: Dr. José Santos Angeles Chimal<sup>(QEPD)</sup>**

**Codirector de Tesis: Dr. Armando Herrera Arellano**

**Cuernavaca, Morelos, México a 02 de octubre del 2021**

**Lugar y fecha de realización de la tesis:**

Cuernavaca Morelos México a 02 de octubre del 2021

**Miembros del comité tutorial:**

**Tutor Principal:** Dr. Armando Herrera Arellano

**Tutor Personal:** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

**1° Vocal:** Dra. Luz María González Robledo

**2° Vocal:** Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

**3° Vocal:** M. en C. Verónica Chávez López

**Miembros del jurado de examen:**

**Presidente:** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

**Secretario:** Dra. Luz María González Robledo

**1er Vocal:** Dra. María del Carmen Villagrán Herrera

**2do. Vocal:** Dr. Armando Herrera Arellano

**3er. Vocal:** Dr. José Santos Ángeles Chimal

**Fuente de financiamiento:**



## **AGRADECIMIENTOS:**

In Memoriam del Dr. José Santos Angeles Chimal<sup>(QEPD)</sup>, el director de este proyecto, de quien aprendí mucho académicamente pero quien me enseñó sobre todas las cosas humanidad, siempre lo recordare con mucho respeto y cariño.

También quiero agradecer a mi sínodo. Al Dr. Herrera, por haber tomado la batuta de mi proyecto y poner tanta atención en mi escrito, sin él este documento no estaría completo. A la Dra. Luz María quien desde el primer momento me brindo todo su conocimiento para lograr un mejor trabajo, gracias también por compartir en mi comunidad su investigación demostrando que la ciencia es para todos. Al Dr. Santa Olalla<sup>(QEPD)</sup> que me abrió las puertas de su laboratorio y estuvo siempre dispuesto a apoyarme en lo que fuera necesario. A la Dra. Villagrán por compartir su interés y conocimiento de la enfermedad de Chagas, gracias por complementar este trabajo. Por ultimo al Dr. Mario Cruz, quien también me brindo su conocimiento y su ayuda como parte de mi sínodo.

No tengo palabras para dar todas las gracias que se merece mi familia, por todo el amor y el apoyo que me han brindado en cada uno de mis proyectos, siempre han sido mi soporte, mi fuerza, y les debo cada uno de mis logros, a mi mamá Norma y mi abuelita Francisca, las mujeres que más admiro y a mis hermanos Dani y Alex que me llenan la vida de felicidad.

Quiero agradecer especialmente a mi familia escogida Gueorgui López, que es simplemente el mejor compañero de vida que uno pudiera tener, gracias por ser mi escucha, mi equipo, por ser espejo y felicidad compartida, gracias por rescatarme de las aflicciones que implica a veces el ser estudiante, pero sobre todo gracias porque desde que te conozco eres en el mundo todo lo que fosforece.

Muchas gracias a todos mis compañeros del laboratorio, quienes hicieron del posgrado un proceso divertido y agradable, en especial a Jose Luis por su paciencia y por enseñarme tantas técnicas de laboratorio, a Nataly que vino desde Queretaro para ayudarme a purificar las muestras, Liz, Diana, Andrea Teran y Kenia con quienes trabaje más de cerca, por ser tan comprometidas y a la Biol. Belén por correr con nosotros cuando algo se necesitaba y apoyarme con los datos de mis muestras. Por ultimo muchas gracias a mi amiga Michelle mi revisora externa por el cariño puesto en mi escrito.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 Epidemiología.....	8
1.2 Enfermedad de Chagas en México .....	9
1.3 Enfermedad de Chagas en el Estado de Morelos .....	11
2. MARCO CONCEPTUAL .....	13
2.1 Agente Etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
2.2 Ciclo de Vida .....	14
2.3 Linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
2.4 DTU's Asociadas a la Enfermedad de Chagas .....	16
2.5 Vector Biológico .....	18
2.6 Mecanismos de Transmisión.....	19
2.7 Fases de la Enfermedad.....	21
2.8 Métodos de Diagnóstico .....	21
3. ANTECEDENTES.....	24
3.1 Utilidad de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.....	24
3.2 Empleo de la Técnica de PCR en el estado de Morelos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.....	25
3.3 PCR para la Genotipificación de <i>T. cruzi</i> en México .....	29
3.4 El gen HSP70 como blanco molecular para la correcta identificación de <i>T. cruzi</i> .....	31
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
5. JUSTIFICACIÓN .....	36
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	37
7. HIPÓTESIS.....	37

<b>8. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>9. METODOLOGÍA</b> .....	38
<b>9.1 Diseño del Estudio</b> .....	38
<b>9.2 Procedimientos Técnicos</b> .....	38
<b>10. ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	51
<b>11. RESULTADOS</b> .....	53
<b>11.1 Obtención de la Muestra</b> .....	53
<b>11.2 Purificación de DNA</b> .....	53
<b>11.3 Control de Calidad del DNA</b> .....	53
<b>11.4 Reacciones en Cadena de la Polimerasa</b> .....	57
<b>11.5 Distribución Geográfica</b> .....	65
<b>12. DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>13. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>14. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b> .....	72
<b>15. PERSPECTIVAS</b> .....	73
<b>16. REFERENCIAS</b> .....	75
<b>17. ANEXOS</b> .....	85

## RESUMEN

**Introducción:** *Trypanosoma cruzi* presenta una gran variabilidad genética que actualmente es clasificada en Unidades Discretas (DTU's) o linajes (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y Tcbat). En México, el estudio de la presencia de los linajes de *T. cruzi* ha sido limitado; sin embargo, debido a la importancia de la enfermedad de Chagas en el país, es necesario tener un panorama más amplio respecto a la misma. **Objetivo:** Identificar la frecuencia de las DTU's de *Trypanosoma cruzi* presentes en personas diagnosticadas con la infección que residen en el estado de Morelos y en la zona centro de México. **Métodos:** En este estudio se analizaron 84 muestras de suero y buffy coat (obtenidas del biobanco del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental del Estado de Morelos) por medio de un PCR conjunto (PCRTcTr y PCRDTU), en donde se obtuvieron productos de amplificación que fueron posteriormente sometidos a un sistema de digestión enzimática RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism por sus siglas en inglés) que permitió la identificación de su respectivo linaje. **Resultados:** Por PCRTcTr se confirmó la infección de *T. cruzi* en 61 muestras de las 84 analizadas. Se logró identificar las DTU's de 45 muestras de las 61 positivas para *T. cruzi* con las siguientes frecuencias: TcI, con una frecuencia de 39 (86.66 %); TcIII, con una frecuencia de 1 (2.22 %); y IV, con una frecuencia de 1 (2.22 %), en donde también se encontró la presencia de infecciones mixtas: TcI/II, con una frecuencia de 2 (4.44 %); TcI/III con una frecuencia de 1 (2.22 %); y TcI/IV con una frecuencia de 1 (2.22 %). Estos linajes TcIII y TcIV, no habían sido reportados hasta el momento para la zona centro de México. **Conclusiones:** El linaje con mayor frecuencia encontrado para los estados de la región central de México fue TcI, asimismo las infecciones mixtas que se encontraron mantienen una relación TcI/TcII-TcVI que se ha observado con mayor frecuencia en el sureste de México.

**Palabras clave:** Chagas, PCR, *Trypanosoma cruzi*, Linajes, DTU's

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, it is a very important zoonosis in México. An estimated one point one million people are infected in this country. *Trypanosoma cruzi* is genetically diverse with seven Discrete Typing Units (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI and TcBat). The DTU's geographical distribution in Mexico is very poorly studied. **Objective:** Identification of Discrete Typing Units (DTU's) of *T. cruzi* among inhabitants of the central zone of Mexico. **Methods:** 84 serum and buffy coat sample were studied. First, all participants' buffy coat was processed with the dual PCR system (TcTrPCR and DTUPCR) and *T. cruzi* DTU's was identified by enzymatic digested (Restriction Fragment Length Polymorphism [RFLPs]). **Results:** By PCR<sub>TcTr</sub> we found that of 84 samples analyzed, 61 were confirmed with *T. cruzi* infection. We identified four of six known *T. cruzi* DTU's: TcI 39 (86.66%), TcIII 1 (2.22% y TcIV 1(2.22%) and the mix infections were TcI/II (4.44%), TcI/III (2.22%), TcI/IV (2.22%). TcIII and TcIV lineages are the first report for the Mexican central region. **Conclusion:** Of the six known lineages of *T. cruzi* in mammalian host, TcI remains the most prevalent in the states of the central region of the country, while mixed infections continue to maintain the TcI / TcII-TcVI pattern, most often in southeastern Mexico.

**Key Words:** DTU's, *Trypanosoma cruzi*, Dual PCR, Chagas disease, lineage.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología

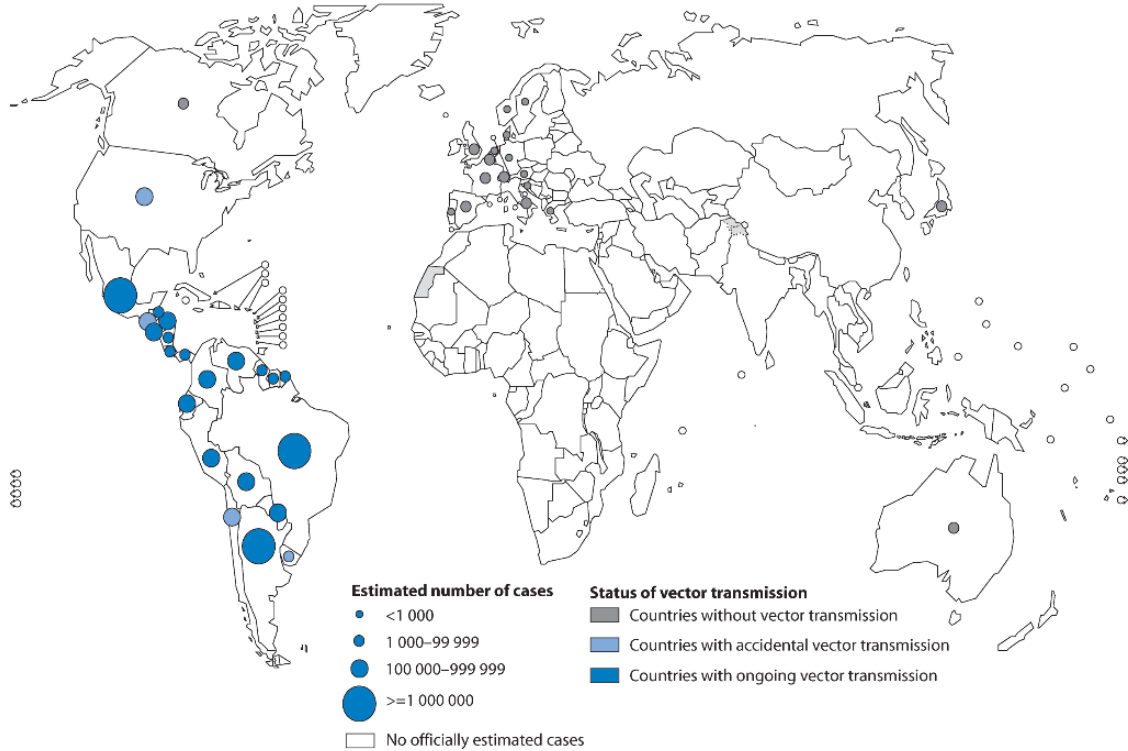
Actualmente, la Enfermedad de Chagas (EC), causada por *Trypanosoma cruzi* (*Tc*), es uno de los problemas más importantes de salud pública, ya que se estima que al menos de 6 a 7 millones de personas en el mundo están infectadas por la misma. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad es endémica de América Latina y forma parte del grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD). Asimismo, se encuentra ampliamente relacionada con factores socioculturales, biológicos y ambientales debido a su estrecha relación con poblaciones que cuentan con altos índices de pobreza y que mantienen poca visibilidad política y social (Ventura-García, et al., 2013; Bastidas, 2018; Pérez-Molina y Lancet, 2018; WHO, 2019).

Sin embargo, se ha observado que debido a la migración poblacional, esta enfermedad se ha diseminado ampliamente a nivel mundial (Figura 1). Esto se debe, principalmente, a que puede ser transmitida no solo por vectores biológicos (triatominos), sino también por vía congénita, a través de transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos de donantes infectados por la EC. Esta es una de las principales razones por la cual esta enfermedad es de alta importancia para el sector salud a nivel mundial (Schmunis y Yadon, 2010; Ventura-García et al., 2013; Arnal et al., 2019).



**Figura 1**

*Mapa de distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo*



*Nota.* Los puntos azules en el mapa indican el número de casos de infección y los espacios en blanco representan a los países en donde no se encuentran datos disponibles. Modificado de *Distribution of cases of Trypanosoma cruzi infections, based on official estimates and status of vector transmission, worldwide, 2006-2009* (WHO, 2010). <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

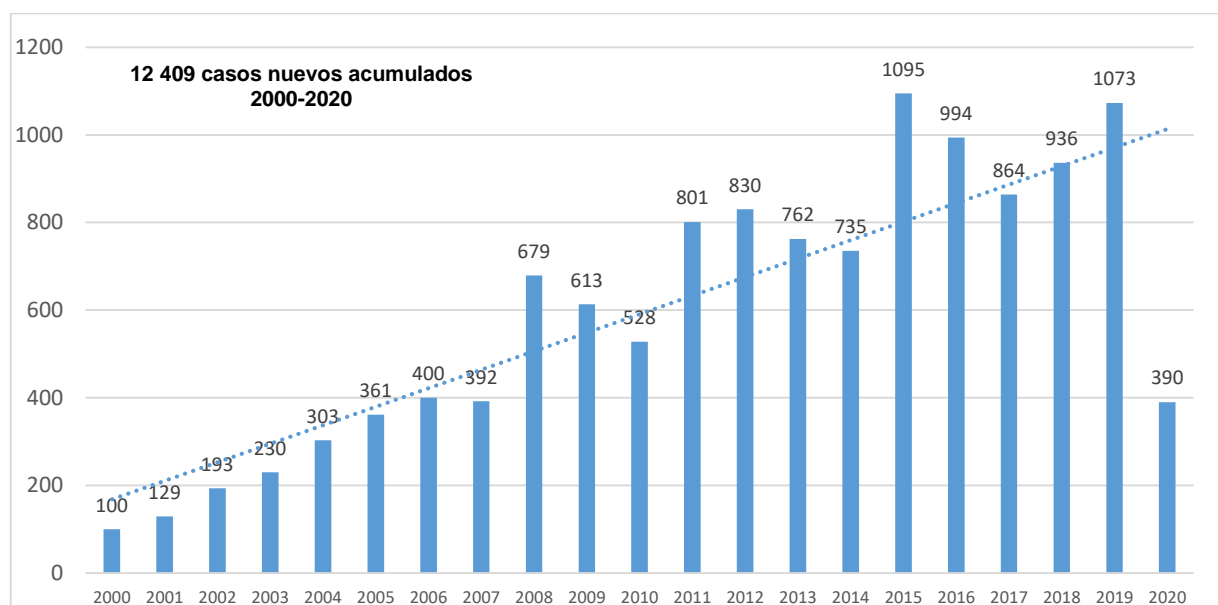
## **1.2 Enfermedad de Chagas en México**

En cuanto al panorama de esta enfermedad en México, se estima que existen al menos 1.1 millones de personas infectadas por la EC, mientras que 29.5 millones se encuentran en riesgo de contraerla. Una de las principales razones por las que esto ocurre es debido a que el vector que transmite la enfermedad se encuentra ampliamente distribuido en el país (dos terceras partes del mismo), además de que México cuenta con al menos 13 especies de triatomos de importancia epidemiológica, es decir, que son capaces de transmitir dicha enfermedad (Rojo-Medina et al., 2018; Arnal et al., 2019).

Con relación a lo anterior, se observó un incremento en el número de casos reportados para la EC, específicamente, en el periodo 2000-2020, lo cual dio como resultado un total de 12 408 casos acumulados –agudos y crónicos– (DGE, 2021), como se muestra en la Figura 2. Los estados con mayor tasa de incidencia fueron Veracruz, Yucatán, Oaxaca, Morelos y Chiapas. Entre otros datos importantes reportados en los últimos años, la Secretaría de Salud, a través del Manual de Procedimientos Para la Enfermedad de Chagas en México, menciona de manera general que los grupos más afectados por EC se encuentran entre los 25 y los 44 años, siendo así los adultos jóvenes los que presentan mayor número de casos de la enfermedad (Secretaría de Salud [SSA], 2019; Dirección General de Epidemiología [DGE], 2021).

**Figura 2**

*Gráfica de casos agudos y crónicos de la Enfermedad de Chagas en México reportados del 2000 al 2020*



*Nota.* En el eje de las X se observa cada uno de los años desde 2000 hasta 2020 y en el eje de las Y el número de casos. En esta gráfica, los valores de la pendiente son:  $y = 42.252x + 126.09$ ,  $R^2 = 0.6869$ .

Cabe resaltar la disminución significativa del número de casos reportados en 2020 (Figura 2). Esto posiblemente se debe a que la gran mayoría de casos reportados proviene de los Bancos de Donación de Sangre, en donde se detecta en los candidatos a donadores de sangre la presencia de la enfermedad. Sin embargo, durante este año y debido a la contingencia sanitaria provocada por

el COVID-19, la participación voluntaria de personas que hicieran donaciones disminuyó drásticamente en México. También es posible que no se estén llevando a cabo el mismo número de pruebas para la detección de la EC en los laboratorios estatales por la emergencia sanitaria antes mencionada.

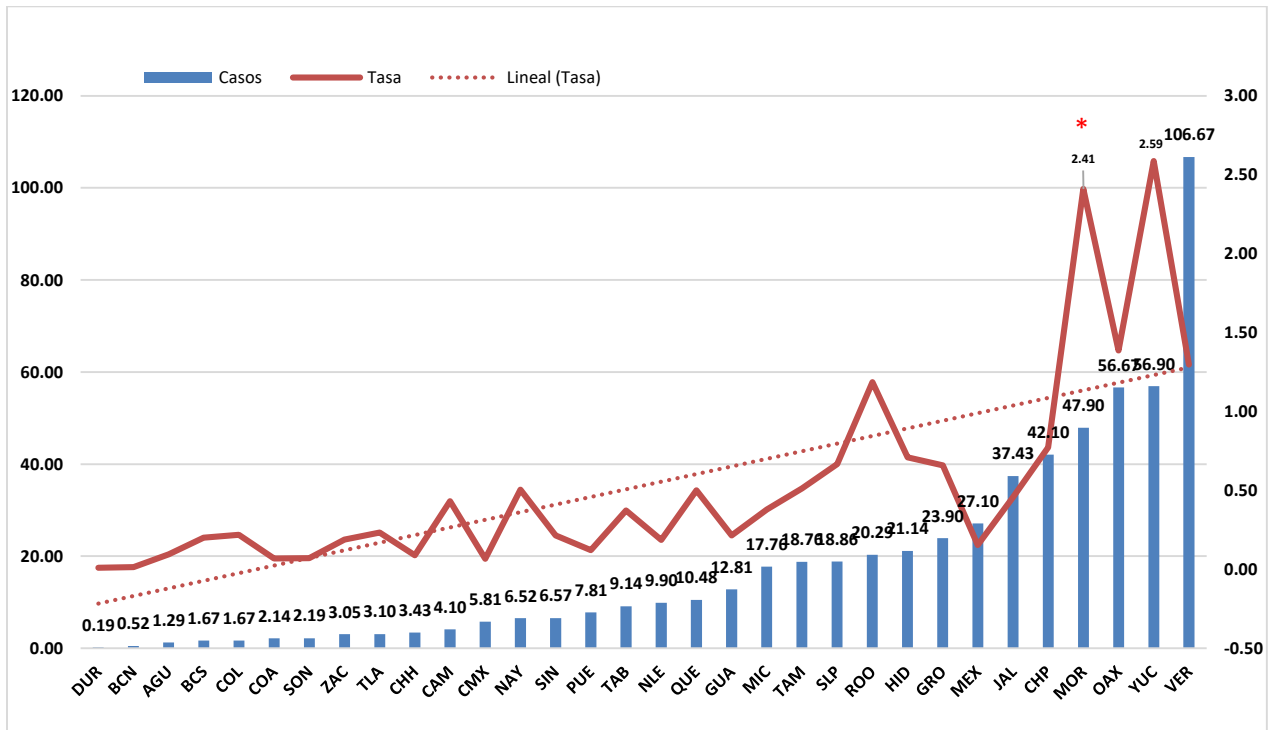
### **1.3 Enfermedad de Chagas en el Estado de Morelos**

De igual manera, es importante mencionar el panorama para la EC en el estado de Morelos, ya que pertenece a un área endémica de la enfermedad y en los últimos años se ha posicionado de manera frecuente entre los primeros 5 lugares de los estados con mayor tasa de incidencia de la EC (Ángeles, 2016a) y con mayor número de casos acumulados en el periodo 2000-2020 (DGE, 2021). En particular, de acuerdo a los datos reportados por la DGE, tan solo para 2020, Morelos se ubicó en el cuarto lugar a nivel nacional de los estados con mayor número de casos agudos y crónicos de la EC y en segundo lugar con mayor tasa de incidencia (Figura 3).

Por otra parte, recientes publicaciones realizadas en 2019 por Herrera-Arellano y colaboradores, evidenciaron un dato antes inédito para la EC en el estado: notificaron el 2 % de prevalencia de la Enfermedad de Chagas en donadores de sangre humana serológicamente negativos (PCR positivos), es decir, en pacientes “aparentemente sanos” para muestras obtenidas en bancos de sangre.

**Figura 3**

*Gráfica del promedio de casos acumulados y tasa de incidencia de la Enfermedad de Chagas en México del 2000 al 2020*



*Nota:* En el eje de las X se pueden observar los estados de la república mexicana, mientras que en el eje de las Y se observa del lado derecho la tasa de incidencia por cada 100 000 habitantes y del lado izquierdo el promedio de casos acumulados. Asimismo, se pueden observar estos datos para el estado de Morelos, señalados con un asterisco (\*).

## 2. MARCO CONCEPTUAL

### 2.1 Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*

**Tabla 1**

*Clasificación Taxonómica de Trypanosoma cruzi*

Clasificación	
<b>Reino</b>	Protista
<b>Phylum</b>	Euglenozoa
<b>Subfilum</b>	Mastigófora
<b>Clase</b>	Sarcomastigófora
<b>Orden</b>	Kinetoplastida
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae
<b>Género</b>	Trypanosoma
<b>Especie</b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

*Nota.* Modificado de *Diagnóstico de Trypanosoma cruzi en muestras de sangre y suero por métodos serológicos y moleculares* (Higuera, 2005).

Esta enfermedad es causada por un protozoario flagelado de la familia *Trypanosomatidae*, llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual se caracteriza por presentar ADN nuclear y extranuclear. Este último, se encuentra en una única mitocondria denominada cinetoplasto. A su vez, el cinetoplasto presenta dos tipos de estructuras: minicírculos y maxicírculos, y a partir del mismo se origina la estructura flagelar, la cual se exterioriza por una invaginación de la membrana nuclear (Higuera, 2005). Dentro de su morfología, según Canil (2011), *Trypanosoma cruzi* presenta tres etapas o tipos de estadios:

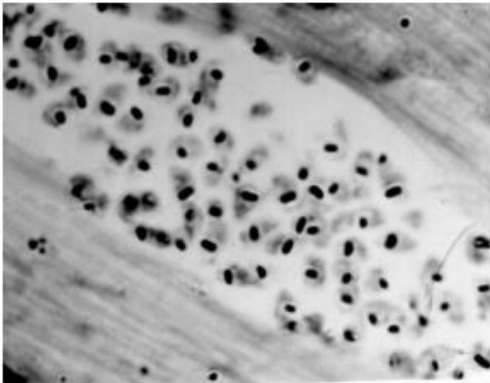
1. Amastigote: Presenta una forma redonda y pequeña, asimismo, posee un núcleo y un cinetoplasto, y su flagelo se posiciona de manera intropotoplasmática, como se muestra en la Figura 4 (a).
2. Epimastigote: Presenta el cinetoplasto delante del núcleo con una membrana ondulante corta y un flagelo anterior libre.
3. Tripomastigote circulante: Es la forma sanguínea del parásito que se caracteriza por presentar una forma alargada móvil y DNA nuclear y extranuclear, en donde el núcleo se

localiza en una posición central y la membrana ondulante se extiende desde el cinetoplasto en dirección anterior hacia el flagelo, que se libera en el extremo anterior, como se muestra en la Figura 4 (b).

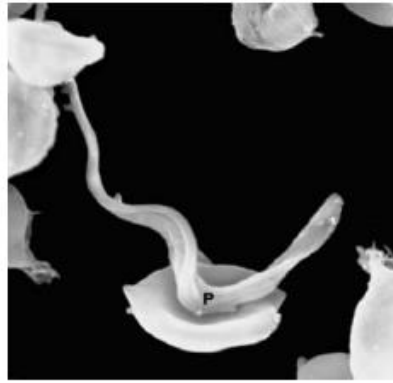
#### Figura 4

*Morfologías principales de Trypanosoma cruzi: (a) Amastigote y (b) Tripomastigote*

a)



b)



*Nota.* Modificado de *Diagnóstico de Trypanosoma cruzi en muestras de sangre y suero por métodos serológicos y moleculares* (Higuera, 2005).

## 2.2 Ciclo de Vida

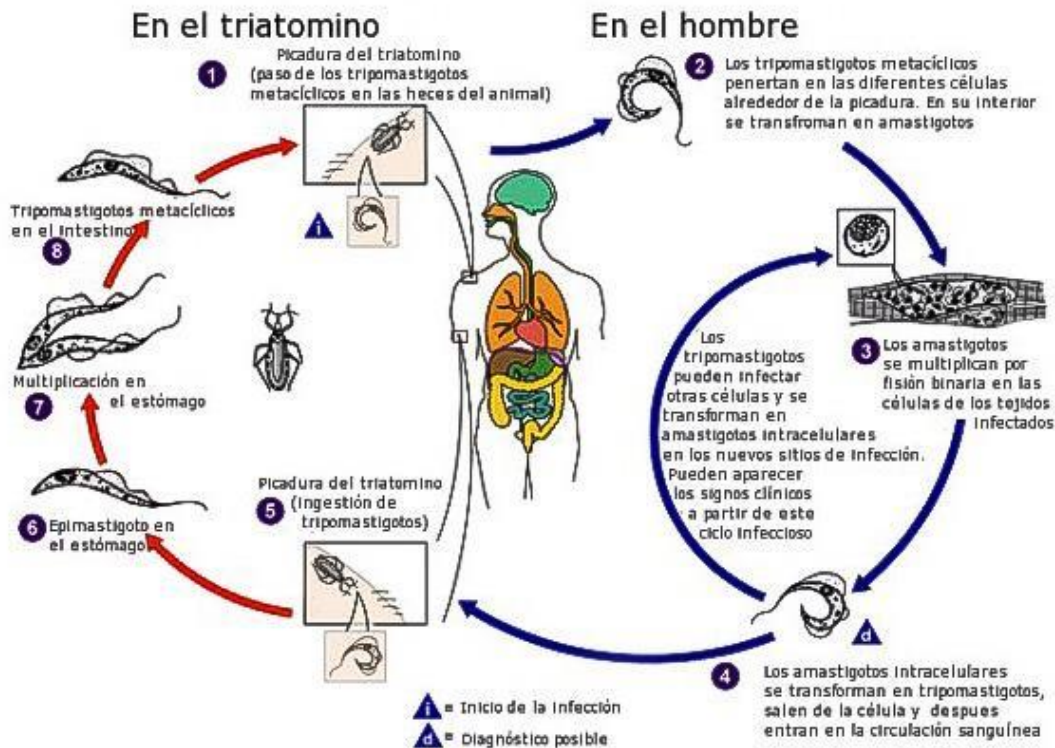
El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* se alterna entre un organismo hospedero vertebrado y un vector invertebrado. Este comienza cuando una chinche adulta (vector) ingiere el parásito como consecuencia de alimentarse de la sangre del hospedero vertebrado infectado (Salazar-Schettino et al., 2016; Bastidas, 2018). Una vez que el parásito se encuentra dentro del vector, migra hacia el intestino medio del insecto; es aquí donde se multiplica rápidamente por división binaria y pasa de tripomastigote a epimastigote. Después, a través de un proceso denominado metaciclogénesis, el epimastigote logra diferenciarse en tripomastigote metacíclico y se excreta en las heces y orina del vector. De este modo, el parásito puede entrar en contacto con la piel y la mucosa ocular, nasal o bucal del hospedero vertebrado (Higuera, 2005; Díaz y González, 2014).

Cuando los tripomastigotes metacíclicos logran infectar un hospedero vertebrado, invaden células de diferentes tejidos y después se transforman en amastigotes, y se multiplican en el citoplasma.

Después de varios ciclos de división celular, estos adquieren su forma infectante (tripomastigote), gracias a la cual rompen las células y son liberados en el torrente sanguíneo, en donde pueden ser ingeridos nuevamente por el insecto vector o infectar nuevas células, completándose así el ciclo, como se muestra en la Figura 5 (Pérez-Molina y Lancet, 2018).

**Figura 5**

*Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi*



*Nota.* Modificado de *Parasites American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)*, de Center for Disease Control and Prevention, (2019). (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

### 2.3 Linajes de *Trypanosoma cruzi*

A lo largo de los años, ha aumentado considerablemente el conocimiento que se tiene sobre la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi*. En particular, en 1996, Souto realizó una de las primeras divisiones de los linajes de *T. cruzi*, en donde propuso un linaje más conservado TcI y uno más divergente TcII (Souto, 1996, como se citó en Bastidas, 2018). Después, para el año 2009,

Zingales y colaboradores llevaron a cabo un consenso para proponer una nomenclatura intraespecífica para los linajes génicos o Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* (Tabla 2). Por consiguiente, tomaron en cuenta estudios previos en donde se proponían los siguientes dos grupos principales de linajes: TcI y TcII, además de la subdivisión del grupo TcII en 5 linajes principales: TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcII d y TcIIe (Brisse y Tibayrenc, 2000). La diferencia entre esta nomenclatura y la propuesta por Zingales et al. (2009) es que el linaje TcII ya no se divide en 5 subgrupos, sino que cada uno de estos grupos constituye una DTU independiente.

**Tabla 2**

*Clasificación de linajes de T. cruzi*

<b>DTU</b>	<b>Abreviación</b>
<i>T. cruzi</i> I	TcI
<i>T. cruzi</i> II	TcII
<i>T. cruzi</i> III	TcIII
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV
<i>T. cruzi</i> V	TcV
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI

*Nota.* Tomado de *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.* (Zingales et al., 2009).

En la actualidad, se sabe que existe una nueva DTU que no se encuentra dentro de la clasificación mostrada anteriormente. Esta nueva DTU se llama Tcbat y se encuentra altamente asociada a los murciélagos (Lima et al., 2015). Por lo que el número total de Unidades Discretas de Tipificación reconocidas actualmente es de siete, tomando en cuenta esta última mencionada: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y Tcbat.

#### **2.4 DTU's Asociadas a la Enfermedad de Chagas**

Se ha observado que las DTU's se encuentran ampliamente distribuidas en toda América Latina (ver Figura 6), siendo la TcI la DTU más abundante y heterogénea (Muoz et al., 2013). Algunas de ellas se encuentran relacionadas directamente con la especie de vector al que parasitan e incluso a los ciclos domésticos y silvestres de transmisión del parásito, como es el caso de TcI en



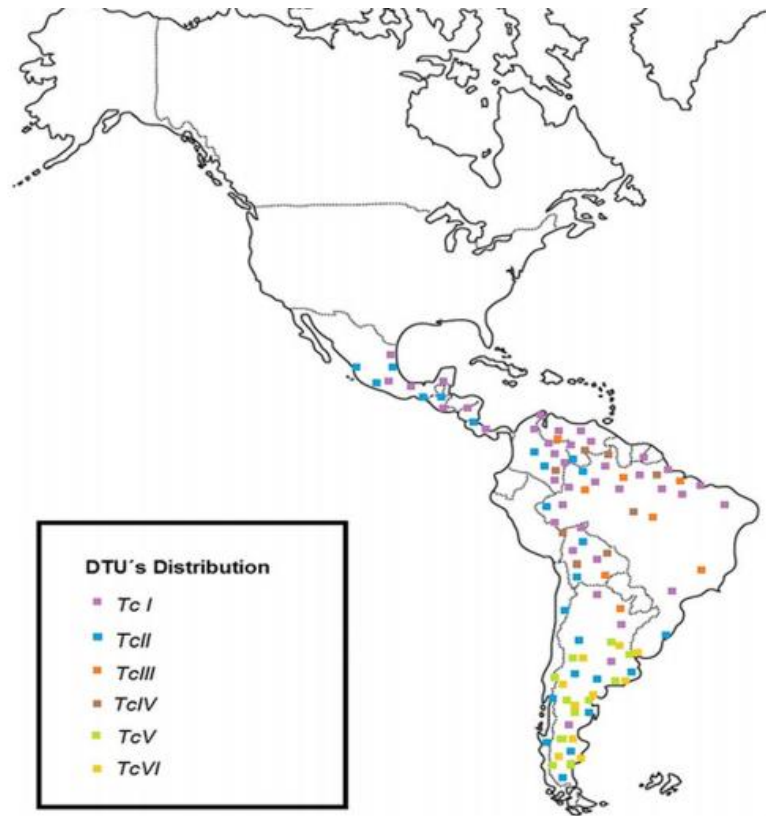
Colombia, Venezuela y países de Centro América (Padilla et al., 2017), mientras que TcII, V y VI se han relacionado con los países del Cono Sur y los linajes III y VI, que suelen ser los menos frecuentes, solo se han reportado en transmisiones selváticas con pocos reportes de infección en humanos (Westenberg et al., 2005).

De igual modo, existe evidencia de la posible relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la alteración de la respuesta humoral ante infecciones chagásicas, debido a que se ha demostrado que la respuesta inmune provocada por cada DTU puede ser diferente (Jiménez et al., 2018; Zingales et al., 2018). Por ejemplo, se ha observado que, en brotes de infecciones chagásicas adquiridas por vía oral, las DTU's que prevalecen con mayor incidencia son: TcI, TcII y TcVI, en donde el linaje que se observa con mayor frecuencia es TcI (Steindel et al., 2008; Marcili et al., 2009). Asimismo, se ha observado que, en manifestaciones de la EC crónica, la presencia de TcI se encuentra relacionada a casos clínicos en donde se observa cardiomiopatía y meningoencefalitis, sobre todo en pacientes inmunodeficientes (Lozano-Kasten et al., 2008; Cura y Schijman, 2013). Además, el linaje TcII se ha encontrado relacionado con megasíndromes del sistema digestivo, como megaeosófago, megaduodeno y megacolon (Cura & Schijman, 2013; Bastidas, 2018).

Los estudios comparativos entre la diversidad génica y las propiedades biológicas del parásito pueden ayudar a describir el comportamiento de *T. cruzi* en cuanto a sus ciclos de transmisión, patogenicidad y sensibilidad a los fármacos, y, de acuerdo con Mñuoz et al. (2013), se debe enfocar en un criterio epidemiológico-biológico, ya que esto puede brindar información de las poblaciones de *T. cruzi* y de su relación con las características de patogenicidad de la enfermedad.

## Figura 6

*Distribución geográfica de los linajes de Trypanosoma cruzi presentes en triatominos, humanos y otros mamíferos del continente Americano*



*Nota.* Tomado de *A systematic review of the Trypanosoma cruzi genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy* (Jiménez et al., 2018).

### 2.5 Vector Biológico

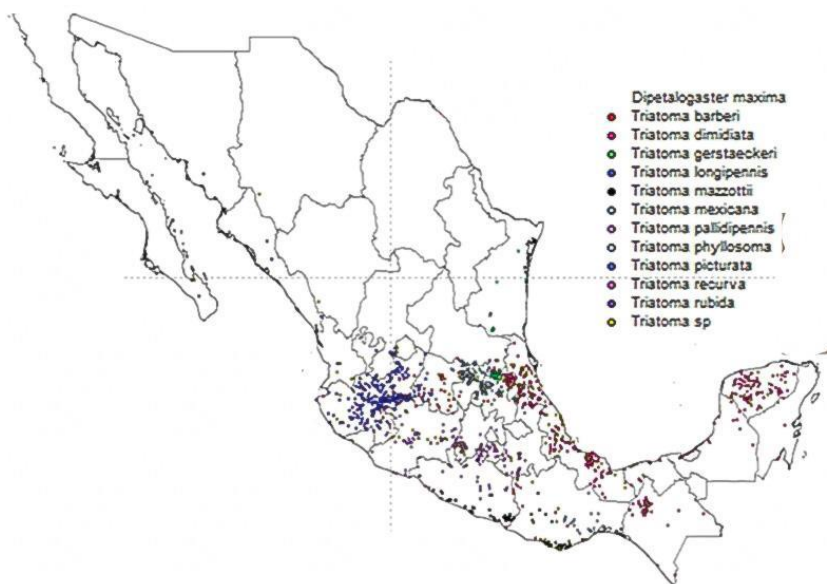
La EC es transmitida por insectos hematófagos, pertenecientes a la subfamilia de los triatominos; esta subfamilia se comprende de un aproximado de 160 especies. En México, se pueden encontrar al menos 32 de ellas, de las cuales 13 tienen importancia epidemiológica (Pettersson y Guhl, 2010; Rojo-Medina et al., 2018).

Según un reporte de Salazar-Schettino et al. (2010), los sectores con mayor índice de infección se encuentran localizados al centro y sur del país debido a que estas zonas se caracterizan

principalmente por su comunidad rural. Sin embargo, para el año 2019, se puede observar que los triatominos se encuentran ampliamente distribuidos en casi todo el país (Figura 7), incluyendo el estado de Morelos, en donde se cuenta con la presencia de al menos tres especies de importancia epidemiológica: *T. barberi*, *T. pallidipennis* y *T. dimidiata*.

### Figura 7

#### *Distribución de triatominos en México*



*Nota.* Modificado de *Enfermedad de Chagas en México* (Rojo-Medina et al., 2018).

### 2.6 Mecanismos de Transmisión

El mecanismo de transmisión más importante para la EC es la vía vectorial por triatominos. Después de la picadura de estos insectos, las personas suelen rascar la zona de punción, contaminando así la herida con heces infectadas por *T. cruzi* y adquiriendo de esta manera el parásito. En México, este tipo de transmisión es el más común y se encuentra altamente asociado a comunidades rurales, en las cuales se pueden encontrar colonias de estos insectos hematófagos dentro de la vivienda (Higuera, 2005; Salazar-Schettino et al., 2010; Bastidas, 2018).

Otro tipo de transmisión es por medio de transfusiones sanguíneas. Este se ha vuelto el segundo tipo más importante de transmisión de la enfermedad porque los mecanismos de almacenamiento de los componentes sanguíneos pueden permitir la supervivencia del parásito *T. cruzi*. Se ha

observado también que el riesgo de adquirir la enfermedad tras recibir una transfusión de un paciente infectado está entre el 10-25 % (Cancino-Faure, 2016). Además, debido a la migración de personas de áreas endémicas a zonas urbanas, la distribución de esta enfermedad ha aumentado considerablemente, generando así mayor riesgo de contagio en países no endémicos. Es por ello que actualmente, algunos países de Europa disponen de una normativa legal para aquellos donantes provenientes de áreas endémicas de la enfermedad, como el Real Decreto 1088/2005 que establece los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión, en donde es obligatorio el cribado relativo a *T. cruzi*, de los potenciales donantes con riesgo epidemiológico de la enfermedad (Salomone et al., 2003; Hernández-Becerril et al., 2005; Zingales et al., 2018).

Entre otras fuentes de transmisión menos frecuentes se encuentra la transmisión a partir de órganos y tejidos infectados diferentes al sanguíneo, es por ello que, durante procedimientos médicos que impliquen este tipo de factores, se debe considerar el perfil de endemicidad de los pacientes implicados en dichas intervenciones (Secretaría de Salud, 2019).

La enfermedad también se puede transmitir de manera congénita porque, durante la etapa del embarazo, una mujer infectada puede transmitirle el parásito al bebé, al ser el parásito capaz de atravesar la barrera placentaria. Es por ello que se deben realizar estudios para detectar la presencia del mismo, teniendo en cuenta que a veces no se presenta sintomatología evidente (Higuera, 2005).

Actualmente, se conoce que se puede llevar a cabo la transmisión de la enfermedad por vía oral, a través de la ingesta de carne cruda o alimentos y bebidas contaminados. Dentro de este mecanismo de transmisión, se ha observado que la forma infectiva de *T. cruzi* puede adherirse al epitelio de la mucosa gástrica, donde posteriormente migra hacia células epiteliales (Díaz y González, 2014).

Por último, otro tipo de transmisión poco común es la infección por actividad laboral (en laboratorios, bioterios y zoológicos), debido a que la contaminación con el parásito ocurre al trabajar con estos microorganismos o sus reservorios (Higuera, 2005).

## 2.7 Fases de la Enfermedad

La EC presenta tres fases principales:

1) Fase aguda: En la mayoría de los casos, la infección pasa desapercibida debido a que no se presentan síntomas marcados de la enfermedad. Normalmente, suelen ser síntomas leves e inespecíficos, como fiebre, dolor abdominal y dolor de cabeza o muscular, los cuales pueden ser confundidos con una infección diferente. En la zona de la picadura, se desarrolla una lesión primaria con inflamación denominada chagoma. Algunas personas después de la picadura pueden presentar signo de Romaña, un edema marcado en el párpado en la zona de la punción, y estos síntomas pueden desaparecer después de 2 a 8 semanas (Higuera, 2005; Blum-Domínguez et al., 2011).

2) Fase indeterminada: Esta es la fase latente de la enfermedad. Tiene un periodo de ventana indefinido debido a que no suele presentar síntomas, por lo que la persona puede durar meses o años sin llegar a la fase crónica (Bastidas, 2018).

3) Fase crónica: Después de haber adquirido la infección, puede transcurrir un periodo de entre 5 a 20 años para que se presente la etapa crónica de la enfermedad. Alrededor del 30 % de los casos con infección progresan hasta esta etapa, en donde se desarrollan las siguientes afecciones: insuficiencia cardíaca, cardiomegalia y trastornos de ritmo y de la conducción cardíaca, así como agrandamiento del esófago o del colon. La esperanza de vida para estos casos se reduce a entre 5 y 10 años, y la recuperación de la misma requiere el empleo de tratamientos costosos, como la utilización de marcapasos o trasplante de corazón (Higuera, 2005).

## 2.8 Métodos de Diagnóstico

- Pruebas parasitológicas

Dentro de estas pruebas se encuentra el xenodiagnóstico, en el cual se utilizan triatómicos libres criados en laboratorio para alimentarse de la sangre del paciente y, después de un periodo de 30 a 60 días de la succión de sangre, se examinan las heces e intestinos del insecto para determinar la presencia de formas de *T. cruzi*, de acuerdo al protocolo descrito por Portela-Lindoso et al., (2003). Actualmente, este método no es recomendado por la OMS (WHO, 2002). Otra de estas pruebas es el hemocultivo, técnica en donde se recolecta sangre venosa para posteriormente llevar a cabo una separación del plasma. El sedimento del mismo se lava con medio LIT y se incuba en la misma

sangre venosa del paciente durante 30, 45 y 60 días para poder observar la presencia de formas características del parásito (Guhl et al., 2001; Higuera, 2005). También existe el diagnóstico diferencial, el cual consiste en la observación de *T. cruzi* en frotis de sangre teñidos con Giemsa (Carrada-Bravo, 2004).

- Métodos Serológicos

En estas pruebas, se busca la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en muestras serológicas. En la etapa inicial de la infección, los anticuerpos contra *T. cruzi* son de tipo IgM, los cuales son remplazados por los de tipo IgG mientras avanza la enfermedad. Entre las pruebas serológicas se encuentran la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la Hemaglutinación Indirecta (HAI) y las pruebas enzimáticas de ELISA (Pérez-Molina y Lancet, 2018).

De acuerdo con el protocolo descrito por Engvall, E. y Perlmann, P. (1971), la prueba de ELISA se lleva a cabo de la siguiente manera: Primero se inmoviliza el antígeno en una fase sólida, sobre la cual ocurre la unión de un primer anticuerpo, y, después, se añade un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, esto permite la visualización de una reacción que indica la cantidad de anticuerpos que han coincidido con el antígeno antes fijado. Sin embargo, este tipo de métodos no permiten la identificación entre las especies de *T. cruzi* o *T. rangeli* (Guhl et al., 2001). En particular, cuando se llevan a cabo diagnósticos clínicos, se recomienda que se realicen al menos dos de las pruebas antes mencionadas (WHO, 2002).

- Pruebas Moleculares

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se refiere a una técnica de biología molecular en la cual se lleva a cabo la amplificación in vitro de una secuencia específica de ADN a partir de una secuencia molde. El fundamento de dicha técnica se encuentra en la propiedad que tienen las ADN-polimerasas para replicar hebras de ADN empleando ciclos de temperaturas generados de manera artificial, donde se utilizan un par de oligonucleótidos que funcionan como indicadores para delimitar la región de ADN que se quiere amplificar (Garduño, 2013). Actualmente, la técnica de PCR es ampliamente utilizada para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, debido a que es muy sensible y específica, incluso cuando se utilizan cantidades muy pequeñas de DNA (Thiele, 1990). En algunos casos, las pruebas serológicas que se realizan en los laboratorios de manera convencional no son capaces de detectar los microorganismos causantes de la infección debido a

la ausencia o a la baja reactividad serológica de los mismos, es por ello que la técnica de PCR se ha vuelto tan importante ya que debido a su sensibilidad se puede utilizar como prueba confirmatoria cuando existen resultados contrarios en las pruebas serológicas (Blum-Domínguez et al., 2011, Monroy, 2015). En México aún no es establecida como un método de detección convencional en los laboratorios estatales, sin embargo, puede llegar a utilizarse como prueba confirmatoria en personas inmunodeprimidas y en menores de 9 meses, también es útil para detectar la enfermedad en donantes de órganos con niveles bajos de CD4 (Secretaría de Salud, 2019).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Utilidad de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

La PCR es una técnica de biología molecular que se basa en la detección de un fragmento de material genómico, obtenido a través de una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN. La enzima polimerasa es la que se encarga de sintetizar estas copias de la secuencia a través de varios ciclos con diferentes temperaturas, que proporcionan las condiciones para que se lleve a cabo esta reacción. Además de esto, se utilizan diferentes elementos, como un par de oligonucleótidos, que sirven como iniciadores en donde se delimita el fragmento que se va a amplificar, los ácidos desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), el cofactor enzimático, ion magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos son importantes en las tres etapas que conforman la PCR, como son la desnaturalización, el alineamiento y la extensión del ADN (Garduño, 2013; Tamay de Dios et al., 2013).

Dentro de la última década, ha sido mayormente utilizada la técnica de PCR como método de diagnóstico parasitológico y, actualmente, es ampliamente utilizada en el ámbito de investigación para la detección de *T. cruzi*. El hecho de utilizar ADN del parásito como blanco molecular para la detección de la enfermedad de Chagas, nos brinda una mayor certeza de poder detectar la enfermedad, debido a que este se encuentra presente en todas las etapas del ciclo de vida del parásito (Higuera 2005).

Esta técnica, a diferencia de las pruebas serológicas u otros métodos de diagnóstico, se puede utilizar en etapas de la enfermedad que tienen baja parasitemia (etapa crónica), también en Chagas congénito para detectar la enfermedad en recién nacidos, en donde aún no se desarrolla una respuesta inmunitaria o, bien, en pacientes con inmunodeficiencias o inmunocomprometidos, en los cuales la producción de anticuerpos es deficiente. Otra de sus aplicaciones es en el seguimiento de los pacientes en tratamiento en donde los métodos inmunológicos no son adecuados, ya que la respuesta de anticuerpos se mantiene por mucho tiempo (Fraga, 2019) o, como lo menciona Herrera-Arellano et al. (2019), para la adecuada detección de candidatos sanos a donadores de sangre humana.



### 3.2 Empleo de la Técnica de PCR en el estado de Morelos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Desde la década de los 80, se comenzaron a realizar los primeros estudios sobre la detección de la de *T. cruzi* a partir de técnicas moleculares. Desde entonces, se han utilizado diferentes blancos moleculares que se encuentran dirigidos a regiones del ADN cromosomal o, bien, del cinetoplasto del parásito, ya sean secuencias en Tandem repetitivas o en genes que codifican para proteínas específicas, tal como se muestra en la Figura 8.

**Figura 8.**

*Oligonucleótidos de PCR empleados en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas*

Nº	Diana	Cebadores	Secuencia cebadores	Productos	Referencias
1	ADN satélite 195pb	TCZ1 TCZ2	5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'	188 pb*	Moser <i>et al.</i> 1989
2	ADNk kinetoplasto región variable	121 122	5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Britto <i>et al.</i> 1993, 1995
3	ADNk kinetoplasto región variable	S35' S36'	5'-ATAATGTACGGGTGAGATGCATG-3' 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Ávila <i>et al.</i> 1993
4	Secuencia repetitiva nuclear esparcida 1025	O1 O2	5'-TGGCTTGGAGAGTTATTGTGC-3' 5'-AGGAGTGACGGTTGATCAGT-3'	250 pb	Requena <i>et al.</i> 1992
5	Espaciador intergénico (ITS1)	F1 F2	5'-GGGAGAGGTTCCAGATGT-3' 5'-GTCGGAGCAGGGACAGC-3'	130 pb	González <i>et al.</i> 1994
6	Repetición Clon 6	Clon 6 F Clon 6 R	5'-GATGCGCATTGTACGA-3' 5'-CTGGCTGGCCTTGATCC-3'	320 pb	Araya <i>et al.</i> 1997
7	Región subtelomérica	Tc189Fw2 Tc189Rv3	5'-CCAACGCTCCGGGAAAAC-3' 5'-GCGTCTTCTCAGTATGGACTT-3'	100 pb	Chiurillo <i>et al.</i> 2003
8	Gen Proteína flagelar	Tc24 F Tc24 R	5'-GACGGCAAGAACGCCAAGGAC-3' 5'-TCACGCGCTCTCCGGCACGTTGTC-3'	250 pb	Taibi <i>et al.</i> 1995

\*pb: pares de bases

*Nota: Modificado de Differentiation between Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli using heat-shock protein 70 polymorphisms (Fraga et al., 2014).*

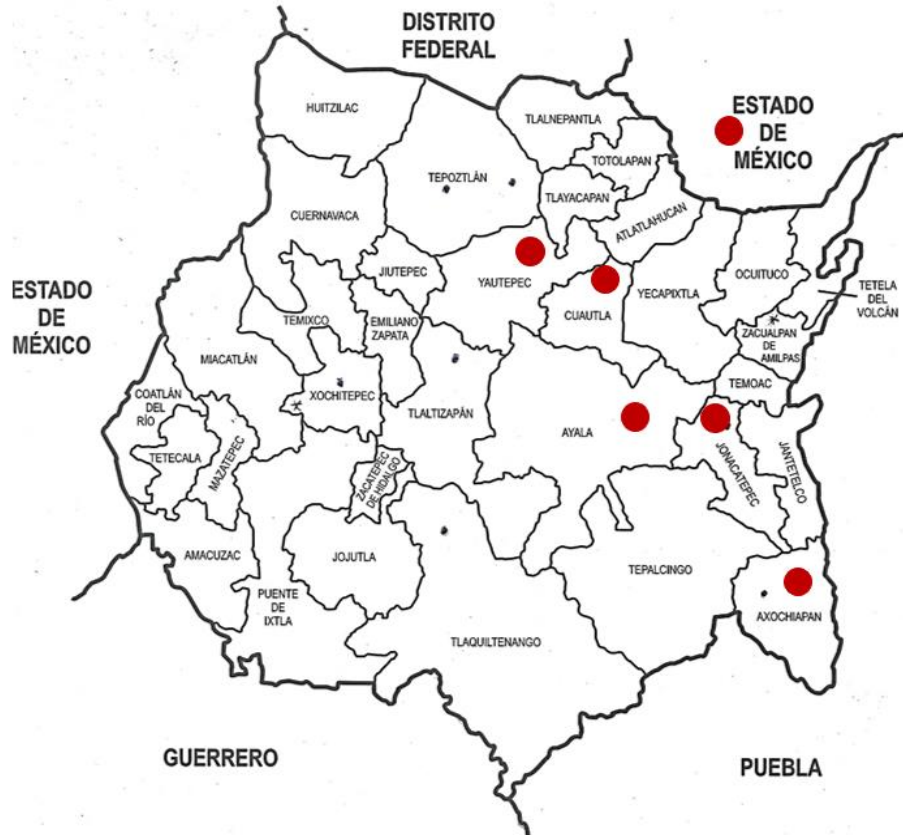
Un referente comparativo entre los oligos utilizados para la detección de *T. cruzi* en Morelos hasta el año 2013 es el de Ángeles-Chimal, quien dio a conocer la estandarización de un procedimiento de PCR punto final, en donde se evaluó la sensibilidad de cuatro pares de oligonucleótidos: TcH2Af/r, Diaz1-Diaz2, Tcz1-Tcz2, TcS35 y TcS36, de los cuales se pudo concluir que el par con mayor sensibilidad para esta técnica era TcS35/TcS36, detectando desde 100 fg de ADN de *T. cruzi* (Ángeles et al., 2013).

En ese mismo año en Morelos, Garduño (2013) también logró estandarizar tanto el protocolo de obtención de DNA genómico como el procedimiento de detección de *T. cruzi*, por medio de la técnica de PCR. En su trabajo, subraya la importancia de llevar a cabo una buena técnica de extracción de DNA para poder obtener un rendimiento óptimo de la técnica de PCR, por lo que estandarizó la extracción del DNA a partir de buffy coat, el cual fue tratado con buffer de lisis de eritrocitos. También, logró estandarizar las condiciones óptimas para la amplificación de los oligonucleótidos TcH2Af-r, TcS35-36, Diaz1-2 y Tcz1-2, que habían sido utilizados para la detección de DNA de *T. cruzi* por medio de PCR y detectó que los iniciadores TcS35-36 eran mucho más sensibles que el resto de los oligonucleótidos normalmente utilizados para la detección de *T. cruzi*. Dentro de sus conclusiones más importantes, además de la estandarización de estas técnicas, es que logró identificar la presencia del parásito en individuos aparentemente sanos por medio de PCR, lo cual nos lleva a concluir que esta prueba es mucho más sensible que las pruebas serológicas (Garduño, 2013).

Para el año 2015, Monroy logró detectar ADN de *T. cruzi* mediante el uso de pruebas de PCR en pacientes que fueron recibidos como donadores de sangre y que tenían un diagnóstico serológico negativo, utilizando los oligonucleótidos TcS35 y TcS36, que son más sensibles y pueden detectar bajas concentraciones del parásito. Encontró *T. cruzi* en muestras de sujetos procedentes de cinco municipios del estado de Morelos y una en el estado de México (ver Figura 9), evidenciando que se deberían utilizar las pruebas de diagnóstico molecular en los bancos de sangre porque en ocasiones no es posible diagnosticar la enfermedad por falta de reactividad de las pruebas serológicas. Además, reforzó la teoría de que la migración es un factor importante para la dispersión de la enfermedad en zonas urbanas (Monroy, 2015).

**Figura 9**

*Georreferencia de pacientes PCR positivos para T. cruzi en el estado de Morelos para el año 2015*



*Nota. Modificado de Diagnóstico molecular para la detección de Trypanosoma cruzi en donadores de sangre seronegativos del estado de Morelos (Monroy, 2015).*

También, para el estado de Morelos, es muy importante el trabajo de Bastidas (2018) ya que hoy en día constituye un serio problema en la epidemiología y el diagnóstico de la enfermedad de Chagas la presencia de otra especie de *Trypanosoma*, es decir, *Trypanosma rangeli*. Este microorganismo suele encontrarse en la misma distribución geográfica que *Tripanosoma cruzi*, sin embargo, *T. rangeli* se considera no patógeno para el hospedero (en este caso el ser humano); sin embargo, al compartir vectores y reservorios es capaz de generar reactividad cruzada en los pacientes, aunque no causa enfermedad. Poder diagnosticar esta diferenciación entre estos organismos es importante debido a que el tratamiento administrado para tratar la EC suele ser muy



### 3.3 PCR para la Genotipificación de *T. cruzi* en México

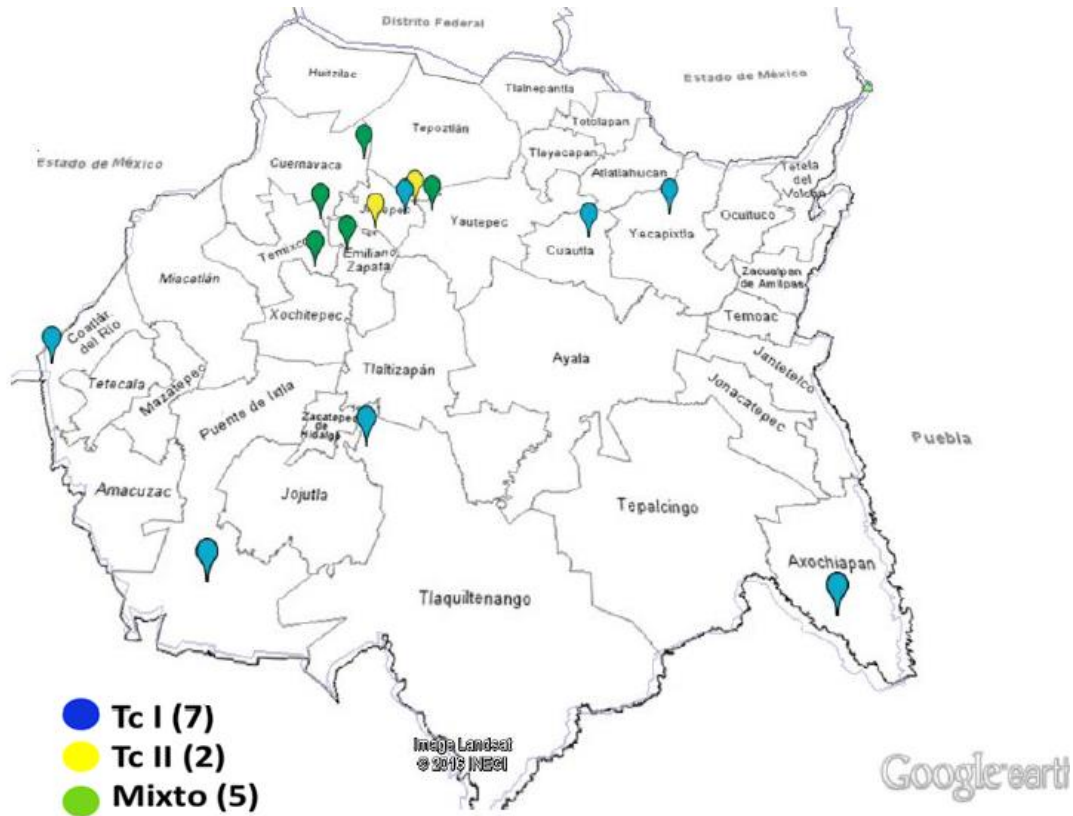
Para determinar las Unidades Discretas de Tipificación de *T. cruzi*, es importante entender cómo están relacionadas con el desarrollo clínico de la EC y realizar también estudios genéticos y epidemiológicos comparativos (Cura, 2015). Es por ello que, a lo largo de los años, se han desarrollado diferentes esquemas de identificación por PCR tanto para diferenciar entre *T. cruzi* y *T. Rangeli* como para la tipificación de las diferentes DTU's de *T. cruzi*. Generalmente, estos esquemas se realizan a partir de una muestra biológica directa o de un aislamiento (y cultivo) de los parásitos *in vitro*, y se requiere la utilización de varias reacciones de PCR convencional, mismas que pueden ser apoyadas por otras técnicas de PCR, como Nested PCR, Hot Start PCR, RFLP o pasos de hibridación y secuenciación (Brisse y Tibayrenc, 2000; D'Ávila et al., 2009; Burgos et al., 2010; Cura, 2015).

En particular, no fue hasta el 2001 cuando Bosseno y colaboradores reportaron la presencia de un linaje de *T. cruzi* predominante en México. En el estudio, analizaron 54 stocks de parásitos, los cuales fueron obtenidos de diferentes aislados de triatomínios y muestras humanas, pertenecientes a diferentes estados de la república mexicana. Estos fueron analizados por la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico o RAPD (por sus siglas en inglés Random Amplified Polimorphic DNA) y se encontró que el linaje TcI está mayormente representado en los diferentes estados de la república mexicana, incluido el estado de Morelos.

De igual forma, en el 2016, Garduño descubrió, a través de una técnica de PCR anidado, la presencia del linaje TcII en siete personas que fueron donadoras en el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea del Estado de Morelos, de las cuales cinco habían sido seronegativas. Además, encontró la presencia de TcI en 11 muestras de la misma población de estudio y cinco unidades que presentaban infección múltiple de TcI y TcII. Asimismo, dentro de los resultados de esta investigación, Garduño mencionó que en el estado de Morelos se encontró una mayor distribución de linaje TcI que de TcII ya que, aunque se encuentra en la misma proporción, TcII solo afecta a cinco municipios del noreste del estado, mientras que TcI abarca siete municipios de la periferia del estado (Figura 11).

**Figura 11**

*Distribución general de linajes de T. cruzi en el estado de Morelos*



*Nota.* En azul, se encuentran los 7 casos que presentaron el linaje TcI; en amarillo, los que presentaron TcII; y, en verde, los linajes mixtos TcI y TcII. Tomado de *Identificación del Linaje de Trypanosoma cruzi en donadores de sangre del estado de Morelos* (Garduño, 2016).

Más tarde, Ángeles et al. (2016b) reportaron la presencia del linaje TcII de *T. cruzi* para 14 muestras de donadores de sangre humana e infecciones mixtas (TcI y TcII) en personas seronegativas que radicaban en más del 30 % de los municipios del estado de Morelos, incluyendo las zonas urbanas, como lo son Cuernavaca y Cuautla. Para el 2019, Villanueva-Lizama y colaboradores describieron por primera vez, en el estado de Yucatán, la presencia de pacientes infectados con los linajes TcII, TcV y TcVI de *T. cruzi*; además de la presencia del linaje de TcI, el cual se encuentra mayormente representado. También en este estudio describieron que, de los pacientes infectados, el 47 % de las infecciones eran múltiples, es decir, que presentaban más de

un linaje de *T. cruzi* al mismo tiempo, lo que sugiere que las infecciones múltiples son altamente comunes.

### **3.4 El gen HSP70 como blanco molecular para la correcta identificación de *T. cruzi***

Como se ha mencionado, uno de los problemas más comunes cuando se lleva a cabo el diagnóstico de la EC es que los triatomíneos que funcionan como vectores de *T. cruzi* también lo hacen para *T. rangeli*. Esto muchas veces significa la superposición de una infección por ambos tripanosomátidos y, aunque *T. rangeli* no se considera patógeno para el ser humano, puede generar confusiones a la hora de realizar un diagnóstico para detectar la presencia de *T. cruzi*, en vista de que ambos comparten características morfológicas y determinantes antigénicos (Fraga, 2019). Por tanto, esto complica el correcto desempeño del diagnóstico de la EC por serología o microscopía. El correcto diagnóstico de la enfermedad de Chagas es muy importante para el paciente, ya que como se mencionó, los medicamentos que actualmente se utilizan para tratar la enfermedad suelen presentar una larga lista de efectos adversos, como anorexia y pérdida de peso, polineuropatía, náusea, vómito, dolor de cabeza y vértigo (Khaw y Panosian, 1995) que se resumen en que el paciente termina abandonando el tratamiento sin completarlo, afectando así directamente la recuperación del mismo.

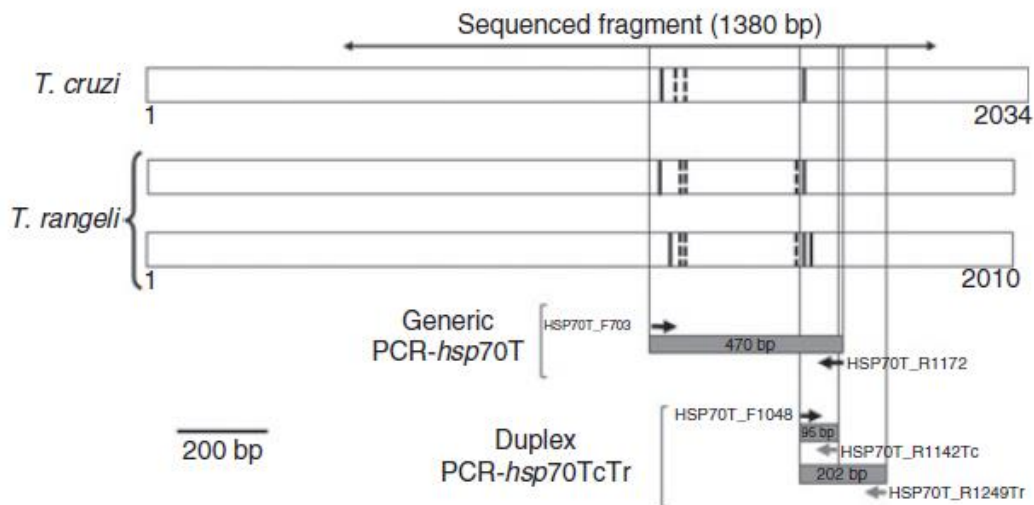
El gen de la proteína Hsp70 ha sido explorado para poder llevar a cabo un correcto diagnóstico diferencial entre especies de tripanosomidos, incluidos *T. cruzi* y *T. rangeli*, debido a que tiene las siguientes características: 1) es una proteína altamente conservada en secuencia y función; 2) es un gen que se organiza en repeticiones en tándem de la cabeza a la cola (Fraga, 2019); 3) ha sido utilizado como marcador evolutivo en diferentes especies, como *Cryptosporidium spp.*, *Babesia spp.*, *Giardia spp.*, *Entamoeba spp.*, *Microsporidium spp.*, *Blastocystis hominis* y *Leishmania genus*; y 4) ha ayudado en la detección y diagnóstico de 14 especies de *Leishmania* (Montalvo et al., 2012; Fraga et al., 2012).

Uno de los trabajos previos más importantes con respecto al estudio de estas proteínas de shock térmico para diferenciar entre *T. cruzi* y *T. rangeli* es el de Fraga et al. (2014), en donde diseñó, desarrolló y evaluó un método de dos PCR conjuntas que permitieron la detección de *T. cruzi*, la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* y la diferenciación de los DTU de *T. cruzi*, basado en el gen HSP70.

El diseño de este método consta de una PCR normal que amplifica un fragmento de 470 pb de una región conservada del gen HSP70 (Generic PCR-hsp70T) y otra PCR dúplex (PCR-hsp70PCR<sub>TcTr</sub>) basada en 3 primers (señalado con flechas negras en la Fig. 12) que amplifican 2 regiones específicas del gen HSP70 (202 pb y 95 pb respectivamente Fig. 12, Dúplex PCR-hsp70PCR<sub>TcTr</sub>) para cada una de las especies antes mencionadas (Ver Figura 12), diferenciando así la presencia de las mismas. En este método, se probó la especificidad de estos primers (oligonucleótidos) frente a 34 cepas de bacterias, virus y parásitos, obtenidos de muestras clínicas y cultivos, y se obtuvo una especificidad del 100%. Se evaluó la sensibilidad que se obtuvo demostrando que la PCR es capaz de detectar desde 10 hasta 100 Fg del parásito o bien hasta un parásito en 200 µl de sangre total. Finalmente fue evaluada en diferentes cepas y colecciones de *T. cruzi* y *T. rangeli* en aislamientos de pacientes, vectores y reservorios.

### Figura 12

Presentación de los genes que codifican para Hsp70



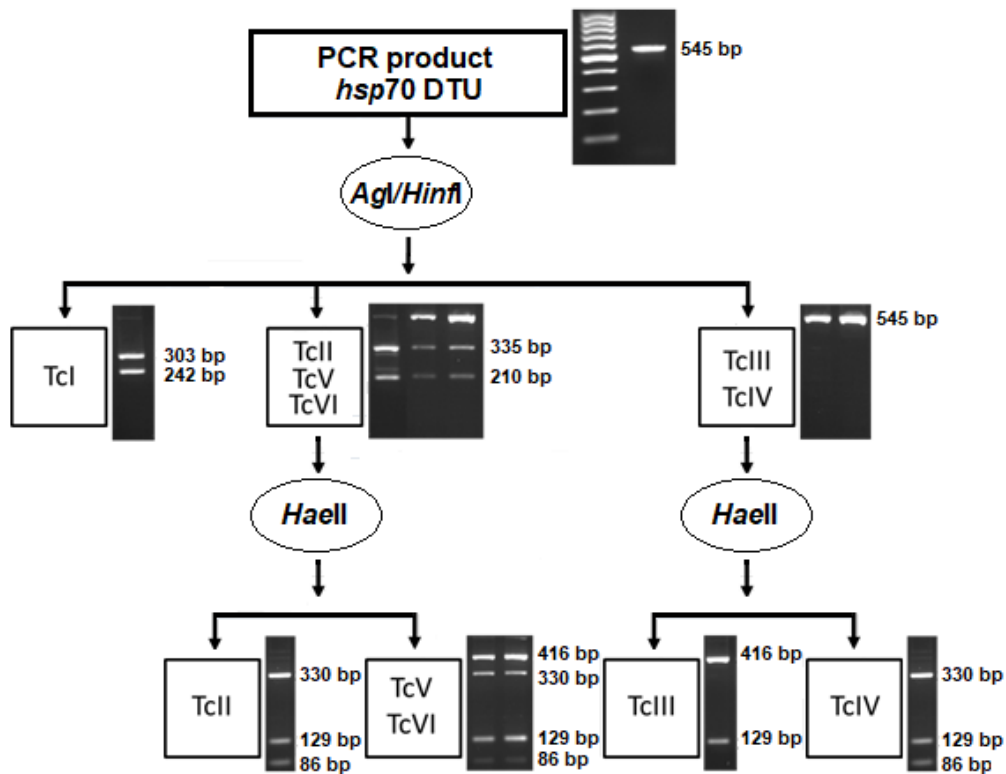
*Nota.* Las cajas blancas representan la región codificante del gen y, las cajas grises, el tamaño de la amplificación. Los cebadores están representados mediante flechas horizontales con su respectivo nombre y orientación 3'-5'. Y, los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción se indican mediante líneas verticales. Tomado de *Differentiation between Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli using heat-shock protein 70 polymorphisms* (Fraga et al., 2014).



Utilizando los productos de amplificación de la Generic PCR-hsp70T, Fraga et al., (2014) diseñaron, a través del análisis de una serie de digestiones enzimáticas (PCR-RFLP), una técnica de reconocimiento de los sitios polimórficos conservados en el gen Hsp70 para cada uno de los linajes, en donde lograron estandarizar la detección directa en muestras clínicas, triatomas y reservorios de los linajes del parásito; sin embargo, esta técnica necesita la combinación con otro método para diferenciar los linajes V y VI. El esquema de detección se realiza siguiendo el patrón enzimático que se muestra en la Figura 13.

**Figura 13**

*Patrón de bandas de la técnica de RFLP para identificar cada uno de los linajes de T. cruzi*



Tomado de *Differentiation between Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli using heat-shock protein 70 polymorphisms* (Fraga et al., 2014).

Basado en este diseño, Bastidas (2018) estandarizó ambas PCR para muestras del estado de Morelos; sin embargo, no llegó a la identificación de los linajes debido a que solo pudo comprobar

la identificación de *T. cruzi* en 21 muestras, descartando la presencia de *T. rangeli* para los municipios de Coatlán del Río, Jiutepec, Tetecala, Cuernavaca, Cuautla, Tlatizapán, Yecapixtla y Tlaquiltenango.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tal como se mencionó anteriormente, la zona centro de México, en específico el estado de Morelos, es geográficamente endémico para la EC; muchos de los poblados que se encuentran en sus 36 municipios son comunidades rurales. Esto, además de las condiciones climáticas y de salud, favorecen la prevalencia de la EC en el estado, además, como se mencionó previamente, la segunda vía de transmisión más importante en el estado es a través de la transfusión sanguínea, debido a que los componentes sanguíneos permiten la supervivencia del parásito y muchas veces estos no logran ser detectados en el cribado realizado en los centros de transfusión sanguínea del estado.

Uno de los aspectos menos estudiados de la enfermedad es la diversidad genética de *T. cruzi*; esta es importante para entender la distribución y circulación de los linajes (DTU's) de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión. Estos linajes suelen mostrar prevalencia e hisotropismo asociada con la severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad en distintas áreas geográficas, también son asociadas con la susceptibilidad a medicamentos antiparasitarios y con la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnosticados en cada región. (Fraga et al., 2019). Como se mencionó previamente, existen reportes de que en el estado de Morelos se ha encontrado la presencia de los linajes I y II (Ángeles et al., 2016a; Garduño, 2016); sin embargo, la técnica empleada durante estos estudios solo permitía la identificación de estos dos linajes.

Dada la posibilidad de la presencia del resto de los seis linajes existentes, se pretende realizar una primera identificación de linajes en muestras de personas con sospecha de infección, donde se utilizará la técnica de identificación utilizada por Fraga et al. (2014), la cual es una técnica que permite la identificación de los linajes a partir de una PCR ligada a la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, más conocida como RFLP.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es un problema importante de salud en el mundo, sobre todo en países endémicos de la misma, como México, en donde se reportó que entre 2000 y 2020 existió un total de 12 408 casos nuevos diagnosticados. En particular, de acuerdo con la DGE (2021), Morelos fue uno de los cinco estados con mayor número de casos y el segundo con mayor tasa de incidencia de la EC durante los últimos 10 años. Además de esto, estudios recientes realizados por Herrera-Arellano et al. (2019), evidenciaron el diagnóstico de la enfermedad oculta en donadores de sangre humana serológicamente negativos. Por lo tanto, estos datos revelan la importancia de seguir investigando aspectos de esta enfermedad en el estado de Morelos para desarrollar, en un futuro, mejores mecanismos de control y prevención contra la misma, además de brindarnos un panorama más amplio respecto a esta enfermedad.

Actualmente, entender cómo están compuestas las poblaciones naturales de *T. cruzi* es uno de los aspectos más importantes a investigar para poder analizar la distribución geográfica asociada a los ciclos de transmisión de esta enfermedad. Asimismo, es indispensable para entender cómo las Unidades Discretas de Tipificación de esta especie (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) están asociadas a patrones de infectividad, patogenicidad y diferentes tipos de manifestaciones clínicas, ya que se ha observado una estrecha relación entre las mismas. Es por ello que, durante el presente estudio, se pretende identificar las DTU's de *T. cruzi* en la población del estado de Morelos, puesto que nos ayudará a entender cómo se están comportando las mismas en relación a la EC.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia de linajes y la distribución geográfica de las Unidades Discretas de Tipificación (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) presentes en muestras de sangre de personas con sospecha de infección por *Trypanosoma cruzi*, residentes de Morelos y de la zona centro de México?

## **7. HIPÓTESIS**

Los linajes o Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* más frecuentes identificados en las muestras de sangre de personas residentes de Morelos y de la zona centro de México, serán TcI y TcII.

## **8. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar la frecuencia y distribución geográfica de los linajes de *Trypanosoma cruzi* (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) presentes en muestras de sangre de personas con sospecha de infección que sean confirmadas para *T. cruzi* y que residan en el estado de Morelos y en la zona centro de México.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Confirmar la infección por *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de personas sospechosas de presentar la infección, mediante la prueba de PCR<sub>TcTr</sub>.
- 2) Determinar la frecuencia de linajes (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) presentes en las muestras de sangre que resulten positivas para la infección por *Trypanosoma cruzi*, y que sean capaces de amplificar para la PCR de Tipificación (PCR<sub>DTU</sub>).
- 3) Determinar la distribución geográfica de los linajes observados.


## 9. METODOLOGÍA

### 9.1 Diseño del Estudio

En este proyecto, se utilizó un diseño observacional, descriptivo, transversal, mínimamente invasivo. Se desarrolló en el Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) a través de las muestras almacenadas en el Biobanco. La parte experimental fue desarrollada con la participación de las instituciones que se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Centros e Institutos de colaboración del proyecto*

<b>Colaboradores</b>	
<b>Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental de la FM-UAEM</b>	Donde se realizó la extracción de DNA, así como las digestiones enzimáticas.
 <b>Hospital del Niño Morelense</b>	Donde se realizaron las PCR <sub>TcTr</sub> y PCR <sub>DTU</sub>

### 9.2 Procedimientos Técnicos

#### Obtención de la Muestra

Se trabajó con 84 muestras procedentes del repositorio de alícuotas de suero, plasma o buffy coat del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental de la FM-UAEM, de personas con sospecha de infección por *Trypanosoma cruzi*, que pasaron un proceso de selección, con base en criterios de inclusión y de exclusión. Asimismo, dichas muestras fueron conservadas a -70 °C para su mantenimiento hasta su utilización. A continuación en la Tabla 4 se describen, por tanto, algunas especificidades:

**Tabla 4***Descripción de las muestras*

No.	Código	Fecha <sup>1</sup>	Institución	Tipo de participante	Estudios diagnósticos previos	Estado de procedencia	Referencia
1	LMTE-TC-001	09/05/2014	FM-UAEM	No Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
2	LMTE-TC-003	16/05/2014	FM-UAEM	No Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
3	LMTE-TC-010	07/08/2014	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
4	LMTE-TC-011	07/08/2014	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
5	LMTE-TC-022	08/09/2015	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
6	LMTE-TC-029	03/06/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
7	LMTE-TC-030	20/05/2015	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
8	LMTE-TC-031	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
9	LMTE-TC-032	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
10	LMTE-TC-033	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
11	LMTE-TC-034	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
12	LMTE-TC-036	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
13	LMTE-TC-037	07/07/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
14	LMTE-TC-038	04/08/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
15	LMTE-TC-039	02/08/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
16	LMTE-TC-040	02/08/2016	FM-UAEM	No Donador	PCR	Morelos	Bastidas, 2018.
17	LMTE-TC-141	20/07/2012	CETS-Morelos	Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
18	LMTE-TC-145	20/07/2012	CETS-Morelos	Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
19	LMTE-TC-159	11/07/2012	CETS-Morelos	Donador	ELISA/HAI/PCR	CDMX	Ángeles et al., 2016b
20	LMTE-TC-160	12/07/2012	CETS-Morelos	Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
21	LMTE-TC-161	12/07/2012	CETS-Morelos	Donador	ELISA/HAI/PCR	Morelos	Ángeles et al., 2016b
22	LMTE-TC-173	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
23	LMTE-TC-174	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
24	LMTE-TC-175	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
25	LMTE-TC-176	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
26	LMTE-TC-177	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
27	LMTE-TC-178	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
28	LMTE-TC-179	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
29	LMTE-TC-180	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
30	LMTE-TC-181	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
31	LMTE-TC-182	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
32	LMTE-TC-183	10/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
33	LMTE-TC-184	10/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
34	LMTE-TC-185	09/10/2017	FM-UAQ	No Donador	NO	Querétaro	Este estudio
35	LMTE-TC-186	11/10/2017	FM-UAQ	Donador	ELISA	Querétaro	Este estudio
36	LMTE-TC-187	01/11/2017	FM-UAQ	Donador	ELISA	Querétaro	Este estudio
37	LMTE-TC-188	01/11/2017	FM-UAQ	Donador	ELISA	Guanajuato	Este estudio
38	LMTE-TC-219	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio

39	LMTE-TC-221	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
40	LMTE-TC-223	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
41	LMTE-TC-224	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
42	LMTE-TC-225	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
43	LMTE-TC-227	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
44	LMTE-TC-262	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
45	LMTE-TC-263	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
46	LMTE-TC-264	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
47	LMTE-TC-265	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
48	LMTE-TC-266	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
49	LMTE-TC-267	21/08/2017	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
50	LMTE-TC-272	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
51	LMTE-TC-274	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
52	LMTE-TC-277	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
53	LMTE-TC-278	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
54	LMTE-TC-279	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
55	LMTE-TC-286	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
56	LMTE-TC-291	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
57	LMTE-TC-310	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
58	LMTE-TC-317	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
59	LMTE-TC-325	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
60	LMTE-TC-330	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
61	LMTE-TC-365	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
62	LMTE-TC-366	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
63	LMTE-TC-374	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
64	LMTE-TC-386	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
65	LMTE-TC-395	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
66	LMTE-TC-404	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
67	LMTE-TC-418	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
68	LMTE-TC-419	18/05/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
69	LMTE-TC-420	19/05/2018	FM-UAEM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
70	LMTE-TC-423	04/08/2018	FM-UAEM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
71	LMTE-TC-424	04/08/2018	CETS-Morelos	Donador	ELISA	Morelos	Este estudio
72	LMTE-TC-425	17/08/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
73	LMTE-TC-426	17/08/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
74	LMTE-TC-427	17/08/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
75	LMTE-TC-428	17/08/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
76	LMTE-TC-429	17/08/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
77	LMTE-TC-430	03/09/2018	FM-UAEM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
78	LMTE-TC-431	09/09/2018	FM-UAEM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
79	LMTE-TC-436	18/09/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
80	LMTE-TC-437	18/09/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
81	LMTE-TC-438	18/09/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
82	LMTE-TC-439	18/09/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
83	LMTE-TC-440	18/09/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio
84	LMTE-TC-441	20/10/2018	DGSPM	No Donador	NO	Morelos	Este estudio

<sup>1</sup>Fecha de obtención de la muestra. FM-UAEM, Facultad de Medicina Autónoma del Estado de Morelos; CETS-Morelos, Centro Estatal de Transfusión Sanguínea; FM-UAQ, Facultad de



Medicina Universidad Autónoma de Querétaro; DGSPM, Dirección General de Salud Pública Municipal; No Donador, No donador de sangre humana; Donador, donador de sangre humana; ELISA; HAI, Hemaglutinación Indirecta; PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa; NO, no cuenta con estudios previos.

#### Criterios de Inclusión de la muestra de sangre para el estudio

- Tener sospecha de infección por *Trypanosoma cruzi*; o bien, contar con reactividad serológica previa o confirmación con PCR previa.
- Formar parte del biobanco del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental
- Haber firmado una carta de consentimiento informado. En caso de ser menores de edad contar, con el consentimiento del representante legal (padre o tutor) de acuerdo a lo establecido en la carta de consentimiento informado.

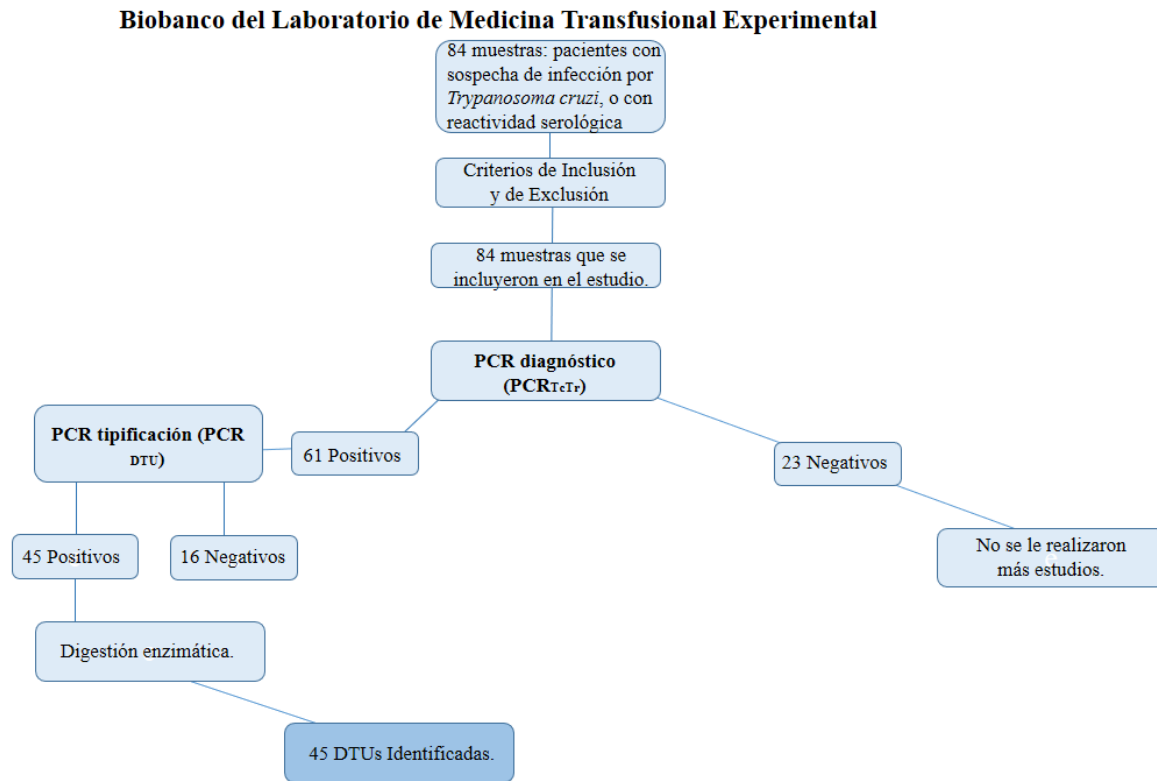
#### Criterios de exclusión

- Muestra Insuficiente.
- Muestra con datos discordantes en el expediente.
- Muestra a la cual no se le logre realizar extracción de DNA.

Finalmente, se muestra un diagrama de flujo de cómo fueron integradas las muestras en este proyecto, eso incluye aquellas que resultaron negativas para la infección por *Trypanosoma cruzi*, y aquellas que no obtuvieron un producto de amplificación en la PCR<sub>DTU</sub> es decir, que, a pesar de ser positivas, no se logró la identificación de su linaje (ver Figura 14).

**Figura 14**

*Diagrama de flujo de las muestras analizadas*



### Purificación de ADN

#### Método Fenol Cloroformo Modificado

Se tomó una alícuota de sangre total o *buffy coat* y se dejó atemperar, posteriormente, se centrifugó la muestra a 400 g por 5 min y se tomó el sobrenadante con una punta (900 µl aproximadamente) sin tocar el pellet. Esta muestra se incubó 15 horas a 65 °C con 500 µl de solución TES y 12 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Después del periodo de incubación, se centrifugó a 400 g por 5 min, y se recuperó el sobrenadante.

En los tubos, se agregaron 500 µl de fenol y se homogenizó por inversión durante 10 min. Luego, se agregaron 500 µl de solución clorofórmica (cloroformo y alcohol isoamílico 24/1) y se mezcló nuevamente por 10 min, posteriormente, se centrifugó a 16 000 g por 5 min. Después, se tomaron 600 µl de la fase acuosa con una punta azul previamente cortada (5 mm de la parte cónica para

evitar el fraccionamiento del ADN) y se colocaron en un tubo nuevo de 1.5 ml. A continuación, se repitió el proceso de extracción por fenol cloroformo para la fase acuosa. A la fase recuperada se le añadieron 600 µl de solución clorofórmica y se homogenizó por inversión durante 10 min, posteriormente, se centrifugaron a 16 000 g y se tomaron, con puntas previamente cortadas, 600 µl de la fase acuosa, y se depositaron en un nuevo tubo eppendorf.

Finalmente, el ADN se precipitó con 20 µl de NaCl al 5 M y 1000 µl de etanol absoluto frío (-20 °C), mezclado por inversión. Después de colocar cada solución, se dejaron a -70 °C o en hielo por 30 min. Pasado el tiempo, los tubos se colocaron en hielo de agua para su descongelamiento. Se centrifugaron a 16 000 g por 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Asimismo, se colocó el tubo en hielo de agua y se le añadieron 1000 µl de etanol al 70 %. Después, se centrifugó a 16 000 g por 10 min a 4°C, se decantó el etanol y se dejaron escurrir los tubos, los cuales se taparon con parafilm y, con ayuda de una aguja estéril, se le realizaron orificios para dejar evaporizar el exceso de etanol, en una estufa a 37 °C por 30 min. Finalmente, fueron resuspendidas en 100 µl de TE (TRIS 10 mM/EDTA 1 mM) pH 7 y se incubaron 1 hora a 65 °C.

### Control de Calidad del ADN

#### Integridad

Para poder observar la integridad del ADN, se realizó un gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio (BrEt), en una cámara de electroforesis con Buffer de TBE (TRIS 0.89 M, Boratos 0.89 M, EDTA 0.02 M, 5x) a 180 v por 50 min. Después, se observó con luz UV en un foto documentador (marca UVP) y se tomará la fotografía para la evidencia.

#### Amplificabilidad (PCR<sub>GAPDH</sub>)

A las muestras purificadas, se les realizó un PCR para amplificar el gen GAPDH como control de amplificación. Este gen, de acuerdo con Garduño (2013), se encuentra presente en las células humanas y está involucrado en procesos de funcionamiento metabólico.

Para este análisis, se tomaron en cuenta las especificaciones de la Tabla 5 y 6, y se utilizaron los oligonucleótidos GAPDH-hum-1 (5' -CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT- 3') y GAPDH-hum-2 (5'- AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC- 3'). Como control positivo, se

utilizó una muestra de DNA humano, cuya integridad fue verificada y estandarizada previamente. Asimismo, como control negativo, se utilizó agua Mili Q (10 µl).

**Tabla 5**

*Mezcla de reacción de PCR (GAPDH)*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad de reactivo para una mezcla final de 20 µl</b>
Agua Mili Q	11.14
Buffer Taq polimerasa	2
MGCL <sub>2</sub> 1.8 mM	1.2
DNTPs	0.4
Oligonucleótido sentido (0.1 µg/µl)	0.4
Oligonucleótido antisentido (0.1 µg/µl)	0.4
Taq polimerasa (5 U)	0.2
ADN muestra (0.1 µg/µl)	4

**Tabla 6**

*Condiciones de amplificación de PCR (GAPDH)*

<b>Termociclador</b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Inicio</b>	94 °C	5 s	1
<b>Apertura de cadenas</b>	94 °C	30 s	35
<b>Alineamiento</b>	62 °C	30 s	
<b>Extensión de las cadenas</b>	72 °C	30 s	
<b>Tiempo extra</b>	72 °C	10 s	1

Una vez realizado lo anterior, se tomaron 9 µl del producto amplificado y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con BrEt, junto con un marcador de peso molecular (DNA ladder 50 pb Invitrogen) y se observó bajo luz ultravioleta para su análisis, donde se observó un producto de 307 pb.

## Rendimiento

Se realizó una cuantificación de DNA en un espectrofotómetro a una absorbancia a 260 nm para poder obtener la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del DNA, obtenido en cada una de las extracciones, y se realizaron stocks de muestra que se llevaron a una concentración final de  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Donde:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de muestra en } \mu\text{g}}{\text{Volumen en } \mu\text{l}}$$

Cabe resaltar que la PCR diagnóstico es capaz de amplificar a partir de una concentración de 10 fg que equivale a  $1 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ .

## Pureza

Se determinó la pureza calculando la tasa de absorbancia a longitudes de onda UV relación: 260/280 nm y relación: 260/230 por espectrofotometría (equipo Lambda 25-Perkin Elmer). Para considerar que un DNA se encuentra puro, se tomaron en cuenta las especificaciones de la tabla 7 (Garduño, 2016).

### Tabla 7

*Codificación de los valores de Pureza del DNA*

Codificación/Pureza		
Ratio	Valor	Pureza
260/280	1.8-2.1	Pureza óptima = 1
	1.6-1.7	Pureza aceptable = 2
	> 2.1	Contaminación con ARN = 0
Ratio	Valor	Pureza
260/230	1.8-2.2	Pureza óptima = 1
	1.6-1.7	Pureza aceptable = 2
	< 1.5	Contaminación con sales/fenol/hidratos de carbono = 0

## Reacciones en Cadena de la Polimerasa

### PCR<sub>TcTr</sub>

Se realizó la PCR dúplex con base al gen Hsp70 para detectar la infección por *T. cruzi* y descartar la infección por *T. rangeli*, de acuerdo a Fraga et al. (2014), donde se utilizaron las condiciones de reacción de la Tabla 8 y 9 así como los siguientes oligonucleótidos:

- 1) HSP70T\_F1048 GCAACCAGATTGTCATCACGAACG
- 2) HSP70T\_R1142Tc GTCCTGCGMCTCGTACTTGGCA
- 3) HSP70T\_R-1249Tr GCCTCCTCAATCTTGCCGCTC.

Además, se utilizó ADN de *T. cruzi* y *T. rangeli*, como control positivo, y agua, como control negativo.

**Tabla 8**

*Mezcla de reacción en la PCR<sub>TcTr</sub>.*

Reactivos	Cantidad de reactivo para una mezcla final de 20 µl
Agua Mili Q	9.05
Buffer Q	5
Buffer courl	2.5
F 1048	0.25
R 1142Tc	0.25
R 1249Tr	0.25
MgCl <sup>2</sup>	1.5
DNTPs	1
Taq polimerasa (1U)	0.2
ADN muestra	5

**Tabla 9**

*Condiciones de amplificación en la PCR<sub>TcTr</sub>.*

Termociclador			
Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos

Inicio	95 °C	5 min	1
Apertura de cadenas	94 °C	40 s	35
Alineamiento	66 °C	1 min	
Extensión de las			
Cadenas	72 °C	1 min	
Tiempo extra	72 °C	10 min	1

#### PCR<sub>DTU</sub>

De acuerdo con el procedimiento de Fraga et al. (2014), se llevó a cabo un segundo PCR con los oligonucleótidos Hsp70T:

- 1) *FHsp70T\_F703* 5'-GCAAGAGCAAGCAGACGGAGG-3'
- 2) *RHsp70T\_R1172* 5'-CTTTGCGTCAATGCGCTCGCG-3'

Donde se utilizaron como controles positivos *T. cruzi* Cepa CanIII, *T. rangeli* Cepa Perija y *R. prolixus* 1984, y, como control negativo, agua Mili Q, así como las condiciones de reacción que se muestran en la Tabla 10 y 11.

**Tabla 10***Mezcla de reacción PCR<sub>DTU</sub>*

Reactivos	Cantidad de reactivo para una mezcla final de 50 µl
Agua Mili Q	29
Buffer Taq polimerasa 10x	5
MGCL <sub>2</sub> 1.8 mM	2.5
DNTPs	1
Oligonucleótido sentido (0.1 µg/µl)	1
Oligonucleótido antisentido (0.1 µg/µl)	1
Taq polimerasa (1 U)	0.5
ADN muestra (0.1 µg/µl)	10

**Tabla 11***Condiciones de reacción en la PCR<sub>DTU</sub>*

Termociclador			
Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicio	95 °C	5 min	1
Apertura de cadenas	94 °C	40 s	35
Alineamiento	54.9 °C	1 min	
Extensión de las Cadenas	72 °C	1 min	
Tiempo extra	72 °C	10 min	1

### Digestión Enzimática

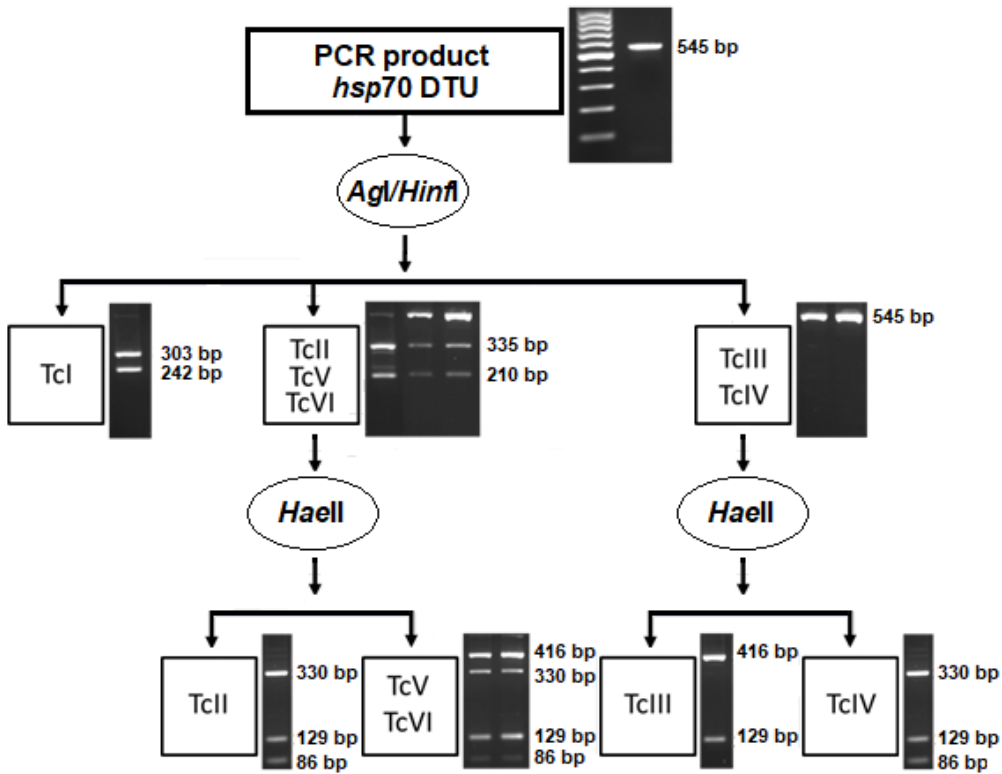
Las amplificaciones sin purificar de la PCR<sub>DTU</sub> (5 µL) fueron digeridas en una suspensión de buffer provisto por el fabricante, con un volumen final de 10 µL, con 1 U AgeI y 5 U de HinfI o 2 U de HaeIII o HaeII (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), y las mezclas de reacción fueron



incubadas a 37 °C por 10 min o 3 h, respectivamente. Después de esto, se identificó en patrón de bandas (ver Figura 14), de acuerdo al protocolo de Fraga et al. (2014).

**Figura 14**

*Enzimas de restricción utilizadas para la identificación de las diferentes DTU's de T. cruzi*



*Nota. Tomado de Differentiation between Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli using heat-shock protein 70 polymorphisms (Fraga et al., 2014).*

## Definición de Variables

**Tabla 12**

*Descripción de las variables del proyecto de investigación*

Variable	Descripción de la variable	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medición
<b>Procedencia</b>	Estado	Estado de la república al que pertenecen	Demográfica, cualitativa Politómica.	Morelos= 1 Querétaro=2 CDMEX= 3 Guanajuato= 4
<b>DNA</b>	Calidad del DNA	Rendimiento (Obtenido a partir de la lectura en Biodrop)	Cuantitativa continua	µg/µl
		Pureza (Obtenido a partir de la lectura en Biodrop)	Cualitativa politómica	Pureza óptima= 1 Pureza aceptable= 2 Contaminación con proteínas= 0
		Integridad (Observada en geles de agarosa al 1.5 %)	Cualitativa dicotómica	Integro= 1 Degradado= 2
		Amplificabilidad (PCR GAPDH)	Cualitativa dicotómica	Amplificó para GAPDH= 1 No amplificó para GAPDH = 2
<b>PCR<sub>TcTr</sub></b>	PCR para diferenciar entre <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	Amplificación del fragmento del gen Hsp70 con los iniciadores F1048, 1142Tc, R1249Tr	Cualitativa dicotómica	Amplificó para <i>T. cruzi</i> = 1 Amplifico para <i>T. rangeli</i> = 2
<b>PCR<sub>DTU</sub></b>	PCR cuyo producto se utiliza en la digestión enzimática	Amplificación del gen Hsp70T 470pb	Cualitativa dicotómica	Amplificó= 1 No amplificó= 2
<b>Digestión enzimática</b>	Identificación de los linajes	Digestión de los productos de la PCR <sub>DTU</sub>	Cualitativa politómica	TcI=1 TcII=2 TcIII=3 TcIV=4 TcV y TcVI=5

## 10. ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en los que resalta la presencia de los principios bioéticos de **autonomía, beneficencia, justicia y no maleficencia** y que llevan como título segundo “De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos”, se desprende las siguientes consideraciones que se tomaron en cuenta para esta investigación:

- A) Conforme al Capítulo I, Artículos 13 y 14, en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.
- B) Asimismo, esta investigación contó con el dictamen favorable del Comité Local de Ética en Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se encuentra registrado con el título de: “Desarrollo de métodos más sensibles para el diagnóstico confirmatorio de la Enfermedad de Chagas”.
- C) De acuerdo con los criterios establecidos en el Artículo 17 II, este proyecto de investigación se consideró de riesgo mínimo, al ser un estudio que empleó el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamiento rutinario, en este caso, extracción de sangre por punción venosa.
- D) Todo sujeto incluido en este proyecto decidió libremente su participación y firmó la carta de consentimiento informado que, de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 20, se entiende por consentimiento informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o, en dado caso, su representante legal autoriza su participación en la investigación con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá y con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. Como datos complementarios, se agregó al final de este documento la carta de consentimiento informado, así como la encuesta que se le realizó al voluntario antes de formar parte de este proyecto de investigación.
- E) Asimismo, conforme al Artículo 14 VI, el procedimiento de extracción de sangre fue realizado por profesionales del campo de la salud, refiriéndose a los mismos bajo los criterios estipulados en el Artículo 114. Por consiguiente, se consideraron profesionales de la salud aquellas personas cuyas actividades están relacionadas con la medicina,

odontología, veterinaria, biología, bacteriología, enfermería, trabajo social, química, psicología, ingeniería sanitaria, nutrición, dietología, patología y sus ramas, que establezcan disposiciones legales aplicables. De igual forma, que posean el título profesional o certificado de especialización legalmente expedido y registrado por las autoridades educativas competentes.

- F) En el mismo sentido, teniendo en cuenta lo estipulado en el Artículo 21, la privacidad del participante fue protegida por medio de un código que se incorporó a la información recolectada. Sin embargo, se pidió autorización para obtener dirección y teléfono particular del sujeto, con el fin de poder darle seguimiento después de la toma de muestras. De igual forma, todos los datos que proporcionaron y toda la información que se obtuvo de las muestras de sangre, serán resguardados y su nombre no será dado a conocer en ningún momento.
- G) También es importante mencionar que el voluntario recibió los resultados de los estudios realizados a sus muestras durante este proyecto. Esto incluye pruebas de serología que, en los casos en los cuales tuvo una repercusión directa sobre su estado de salud, permitieron al voluntario ser referido al servicio médico correspondiente, siendo este el principal motivo de que dichas pruebas se incluyeran en la metodología de este proyecto. Asimismo, el voluntario estuvo informado de que los resultados serán publicados en revistas especializadas, pero su identidad personal no será divulgada en ningún momento.
- H) Las muestras de sangre fueron procesadas exclusivamente para los análisis que se especifican en la investigación. No pueden ser utilizadas para otros fines en México y podrán conservarse solo por 10 años, al término del cual deberá dárseles destino final.
- I) Por último, todas las muestras utilizadas fueron manejadas bajo las normas de seguridad establecidas en el Título Cuarto de la Bioseguridad de las Investigaciones, para investigaciones que trabajan con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, donde se contó con instalaciones y equipo de laboratorio adecuado para el manejo de las muestras que, de acuerdo con lo establecido en el artículo 79, se clasificaron como agentes del GRUPO DE RIESGO II, Este grupo incluye patógenos que pueden causar enfermedades a humanos o animales, pero bajo circunstancias normales no producen riesgos serios a trabajadores de laboratorio, la comunidad, los recursos naturales o el medio ambiente.

## 11. RESULTADOS

Este estudio fue realizado a partir de un repositorio de alícuotas de suero, plasma y buffy coat del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental, del cual se obtuvo un total de 84 muestras de sangre de pacientes sospechosos de infección por *T. cruzi con reactividad serológica*, las cuales fueron sometidas a un proceso de selección a través de los criterios de inclusión y de exclusión, como se menciona en la metodología. Estas 84 muestras fueron evaluadas por un sistema dúplex de PCR, donde se logró determinar la positividad por infección de *T. cruzi*, así como el linaje o DTU correspondiente. Estos resultados se describen de manera más detallada a continuación.

### 11.1 Obtención de la Muestra

Se tomó una alícuota de buffy coat de cada participante a partir del repositorio de buffy coat del Biobanco del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental (LMTE). Gracias a ello se obtuvo un total de 84 muestras, las cuales fueron almacenadas a -70 °C en un ultracongelador hasta su utilización.

### 11.2 Purificación de DNA

La purificación de DNA se llevó a cabo por el método de fenol cloroformo y a través del High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), previamente descrito en la metodología. Por tanto, 84 muestras fueron purificadas, las cuales posteriormente fueron evaluadas para determinar su grado de pureza y de integridad, mediante un espectrofotómetro de densidad óptica, cuyos valores obtenidos se describen a continuación.

### 11.3 Control de Calidad del DNA

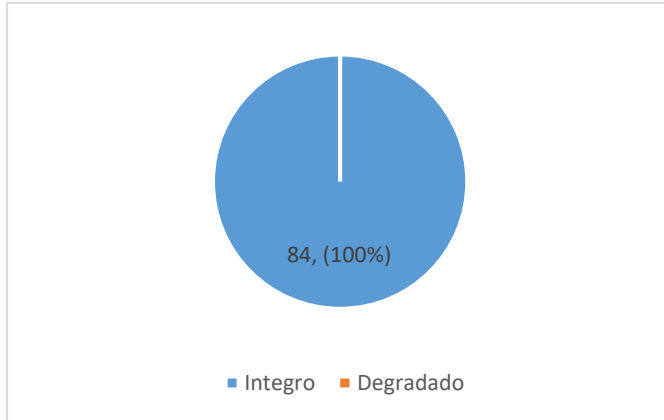
#### Integridad

La integridad de las muestras purificadas se evaluó por medio de la identificación de la presencia de bandas definidas DNA en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con BrEt, observados en un foto documentador (ver Figura 19b). Se integraron al estudio las muestras que mostraron integridad. En estos geles, no se colocó marcador de peso molecular debido a que solo se esperaba observar la presencia de bandas de DNA genómico.

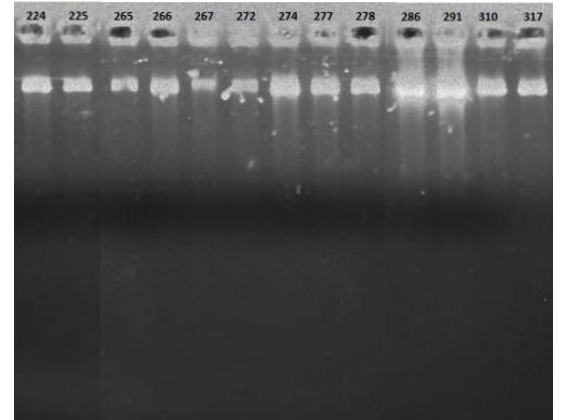
## Figura 19

### *Integridad de las muestras purificadas*

a)



b)



*Nota.* a) Se observa la gráfica que corresponde a las frecuencias absolutas y relativas (%) de las muestras evaluadas para su integridad. b) Ejemplo de un gel de agarosa de integridad donde se observan algunas de las muestras evaluadas.

### Pureza

Para poder evaluar la pureza en las extracciones de DNA obtenidas, se tomaron en cuenta las especificaciones que se describen en la metodología de acuerdo al protocolo reportado por Garduño (2016). Cabe destacar que el 27.8 % de las muestras presentó valores de contaminación con fenoles (ver Tabla 14 y 15); sin embargo, esto no afectó la amplificabilidad de las PCR por lo que se pudieron utilizar estas muestras en las PCR<sub>DTU</sub> y PCR<sub>TcTr</sub> así como en la determinación de DTU's.

**Tabla 14***Valores de pureza*

<b>Pureza</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
<b>Código asignado</b>		<b>absoluta</b>	
<b>1</b>	<b>Pureza óptima</b>	57	67.85 %
<b>2</b>	<b>Pureza aceptable</b>	10	11.9 %
<b>0</b>	<b>Contaminación</b>	17	20.23 %

**Tabla 15***Codificación de los valores de Pureza del DNA*

<b>Codificación/Pureza</b>		
<b>Ratio</b>	<b>Valor</b>	<b>Pureza</b>
<b>260/280</b>	1.8-2.1	Pureza óptima = 1
	1.6-1.7	Pureza aceptable = 2
	> 2.1	Contaminación con ARN = 0
<b>Ratio</b>	<b>Valor</b>	<b>Pureza</b>
<b>260/230</b>	1.8-2.2	Pureza óptima = 1
	1.6-1.7	Pureza aceptable = 2
	< 1.5	Contaminación con sales/fenol/hidratos de carbono = 0

### Rendimiento de DNA

Para determinar el rendimiento de DNA obtenido, se llevó a cabo la fórmula previamente descrita en la metodología. A partir de estos valores, se calculó la media, la desviación estándar y el rango de las concentraciones expresadas  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del total de las muestras extraídas (Tabla 16).

**Tabla 16**

*Valores de rendimiento*

<b>Rendimiento</b>	<b><math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>
<b>Media</b>	0.103
<b>Desviación estándar</b>	0.184
<b>Rango</b>	0.003 - 0.993

### Amplificabilidad

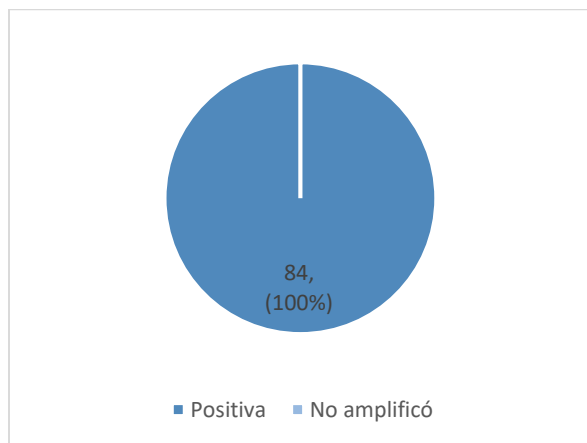
Para evaluar la calidad de las extracciones de DNA se llevó a cabo también una prueba de amplificabilidad por PCR, donde se obtuvo una positividad del 100 % para la amplificación de un gen constitutivo control (GAPDH), lo cual indicó que las muestras son viables para su evaluación por PCR<sub>DTU</sub> y PCR<sub>TcTr</sub>. La positividad fue detectada en geles de agarosa al 2 % donde se observó una banda esperada de 307 pb (ver Figura 20).



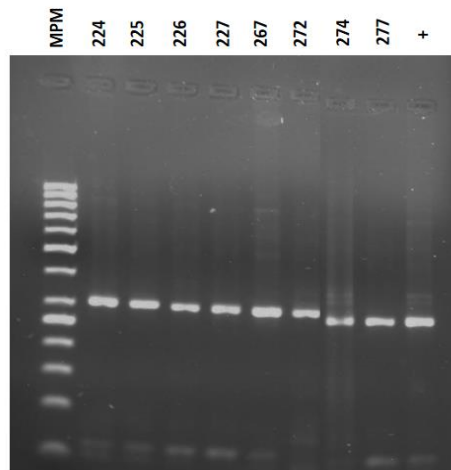
## Figura 20

### Amplificabilidad

a)



b)



*Nota.* a) Gráfica de las muestras con amplificación positiva. b) Gel de agarosa a 2 %, cada pozo con numeración contiene un producto de amplificación de GAPDH de las muestras extraídas. También se observa el marcador de peso molecular de 50 pb (MPM), así como el control + (DNA humano).

### 11.4 Reacciones en Cadena de la Polimerasa

Una vez analizadas las condiciones del DNA obtenido, se pudo realizar la prueba de PCR diagnóstico y confirmación de *T. cruzi* (PCR<sub>TcTr</sub>). Se realizó en las 84 muestras con extracción de DNA.

#### PCR Dúplex (TcTr)

La PCR (TcTr) se llevó a cabo en las 84 muestras como prueba diagnóstica a fin de identificar y confirmar la presencia de *T. cruzi*, además de descartar la presencia de *T. rangeli*. En la Tabla 17, se muestran los resultados de los productos de amplificación obtenidos. Se observaron bandas de amplificación para 61 de las muestras analizadas con un producto de 95 pb correspondientes a la presencia de *T. cruzi*; asimismo no se observó ninguna banda de amplificación de 202 pb correspondientes a *T. rangeli* (ver Figura 21). Tampoco se observó la presencia de infecciones mixtas, lo cual indica que la positividad de la PCR es dada solo por la presencia de *T. cruzi*.

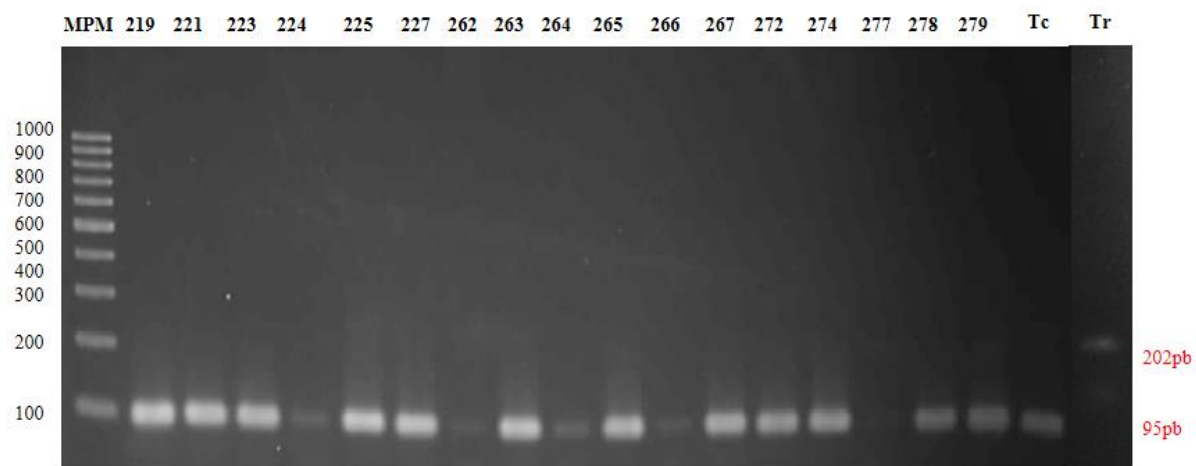
**Tabla 17**

*PCR Dúplex TcTr.*

Pacientes con sospecha de infección (n)		Positivos PCR <sub>TcTr</sub>		Negativos PCR <sub>TcTr</sub>		Total
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	%
84		61	72.61	23	27.38	84 (100%)

**Figura 21**

*PCR<sub>TcTr</sub>*



*Nota.* Gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación de la PCR<sub>TcTr</sub>, en donde se observa del lado izquierdo el marcador de peso molecular (MPM, TrackIt™ 100 bp [Invitrogen, USA]) del lado derecho los pesos moleculares de los controles (202 pb y 95 pb) y en la parte superior el número correspondiente a las muestras evaluadas. Control positivo *T. cruzi* (Tc), Control positivo *T. rangeli* (Tr).

### PCR<sub>DTU</sub>

Una vez identificadas las muestras con infección por *T. cruzi*., se llevó a cabo la PCR<sub>DTU</sub> para las 61 muestras positivas, con la finalidad de obtener los productos amplificados para lograr la identificación de los linajes.

Cabe destacar que solo 45 de las 61 muestras positivas para *T. cruzi* amplificaron para esta segunda PCR. Esto se debe a las limitaciones de la prueba (77 % de sensibilidad). Los resultados de la PCR<sub>DTU</sub> se muestran en la Tabla 18 y los geles de agarosa, donde se observan los productos de amplificación, se muestran en la Figura 22.

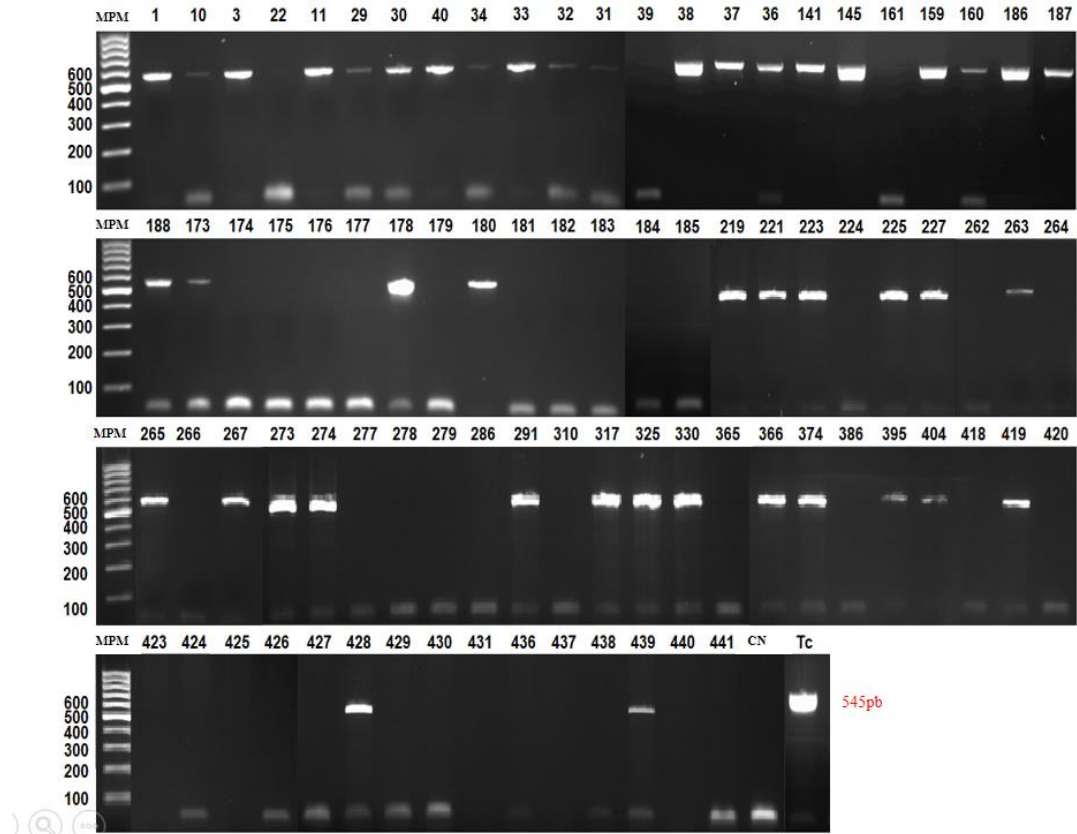
**Tabla 18**

*PCR<sub>DTU</sub>*

	N	Positivos		Negativos		Total
		PCR <sub>DTU</sub>		PCR <sub>DTU</sub>		
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	%
<b>Pacientes positivos para <i>T. cruzi</i></b>						
<i>T. cruzi</i>	61	45	73.77	16	26.22	100

## Figura 22

### PCR<sub>DTU</sub>



*Nota.* Geles de agarosa al 2 %. El número de identificación de la muestra se encuentra en la parte superior de cada uno de los geles. MPM, Marcador de peso molecular; CN control negativo; Tc, *T. cruzi* (control positivo), 545 pb (banda de amplificación esperada).

### Digestión enzimática (RFLPs) e identificación de las DTU's de *T. cruzi*

El resultado del análisis de las digestiones enzimáticas (RFLPs) del 100 % de los productos amplificados de la PCR<sub>DTU</sub> (N=45), se muestra en la Tabla 19, donde se muestran cada uno de los linajes, así como las infecciones mixtas detectadas. Todos los productos de la PCR<sub>DTU</sub> pudieron ser identificados de acuerdo a la digestión enzimática (Ver Figura 23) y al patrón de bandas, diseñado por Fraga et al., 2014.

**Tabla 18**

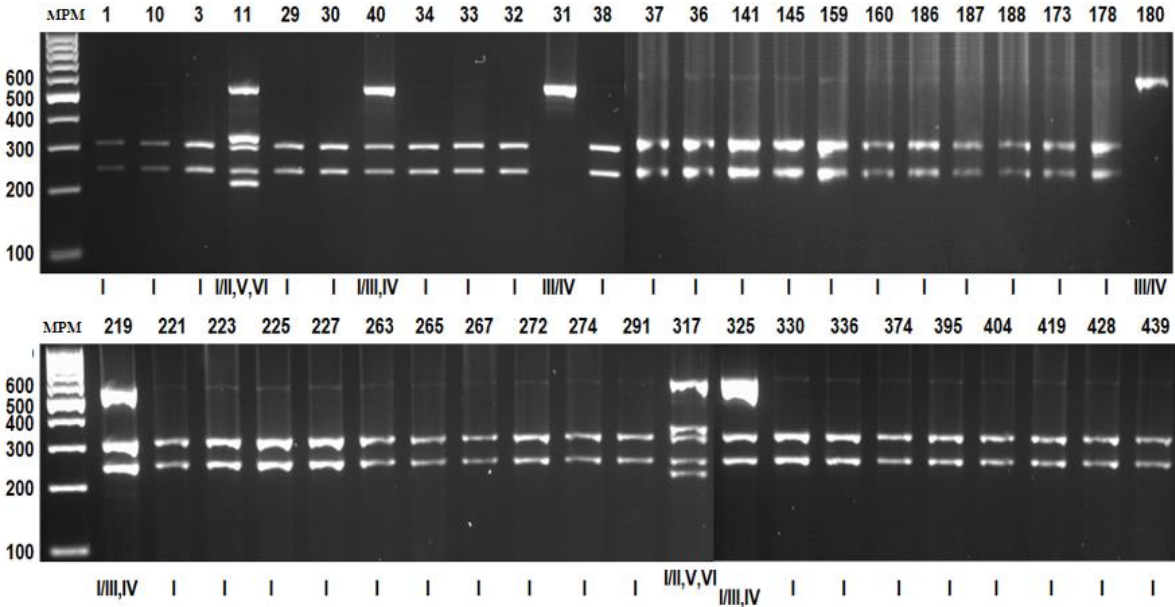
*Identificación de las DTU's de T.cruzi, mediante la técnica de análisis por RFLPs.*

	DTUs Identificadas						
	TcI	TcIII	TcIV	TcI/II	TcI/III	TcI/IV	Total
Frecuencia	39	1	1	2	1	1	45
%	86.66	2.22	2.22	4.44	2.22	2.22	100

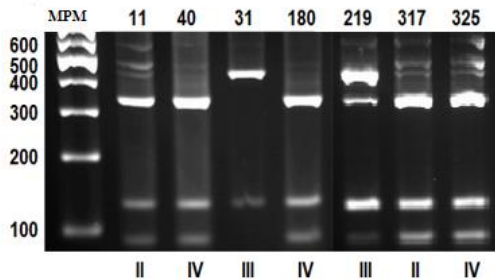
### Figura 23

Geles de agarosa al 2 % de las digestiones enzimáticas obtenidas para la identificación de DTU's de *T.cruzi*.

a)



b)



*Nota:* a) Digestión con las enzimas AgeI y HinfI, b) Digestión con la enzima HaeII. El número de identificación de las muestras se encuentra en la parte superior del gel y el linaje (DTU) correspondiente a esa misma muestra se encuentra en la parte inferior. Asimismo se puede encontrar el marcador de peso molecular en la parte superior izquierda MPM, Marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 bp ladder [Invitrogen, USA]).

Finalmente, en la Tabla 23, se muestra cada uno de los resultados obtenidos para las 84 muestras de pacientes con sospecha de infección, en los que se encuentran los que fueron positivos para *T. cruzi* (n=61), y, de estos, los que amplificaron productos para la identificación de su linaje (n=45).

**Tabla 23**

*Resultado de los métodos serológicos, las pruebas de PCR y el linaje obtenido.*

No.	Código	PCRTcTr	PCRDTU	No.	Linaje
1	LMTE-TC-001	P	P	1	I
2	LMTE-TC-003	P	P	2	I
3	LMTE-TC-010	p <sup>CN</sup>	P	3	I
4	LMTE-TC-011	p <sup>CN</sup>	P	4	I/II
5	LMTE-TC-022	p <sup>CN</sup>	N		.
6	LMTE-TC-029	p <sup>CN</sup>	P	5	I
7	LMTE-TC-030	p <sup>CN</sup>	P	6	I
8	LMTE-TC-031	p <sup>CN</sup>	P	7	III
9	LMTE-TC-032	p <sup>CN</sup>	P	8	I
10	LMTE-TC-033	p <sup>CN</sup>	P	9	I
11	LMTE-TC-034	p <sup>CN</sup>	P	10	I
12	LMTE-TC-036	p <sup>CN</sup>	P	11	I
13	LMTE-TC-037	p <sup>CN</sup>	P	12	I
14	LMTE-TC-038	p <sup>CN</sup>	P	13	I
15	LMTE-TC-039	p <sup>CN</sup>	N		.
16	LMTE-TC-040	p <sup>CN</sup>	P	14	I/IV
17	LMTE-TC-141	P	P	15	I
18	LMTE-TC-145	P	P	16	I
19	LMTE-TC-159	P	P	17	I
20	LMTE-TC-160	P	P	18	I
21	LMTE-TC-161	P	P	19	I
22	LMTE-TC-173	P	P	20	I
23	LMTE-TC-174	N	N		.
24	LMTE-TC-175	N	N		.
25	LMTE-TC-176	N	N		.
26	LMTE-TC-177	N	N		.
27	LMTE-TC-178	p <sup>CN</sup>	P	21	I
28	LMTE-TC-179	N	N		.
29	LMTE-TC-180	p <sup>CN</sup>	P		IV
30	LMTE-TC-181	N	N		.
31	LMTE-TC-182	N	N		.
32	LMTE-TC-183	N	N		.
33	LMTE-TC-184	N	N		.
34	LMTE-TC-185	N	N		.
35	LMTE-TC-186	p <sup>CN</sup>	P	22	I

36	LMTE-TC-187	p <sup>CN</sup>	P	23	I
37	LMTE-TC-188	p <sup>CN</sup>	P	24	I
38	LMTE-TC-219	p <sup>CN</sup>	P	25	I/III
39	LMTE-TC-221	p <sup>CN</sup>	P	26	I
40	LMTE-TC-223	p <sup>CN</sup>	P	27	I
41	LMTE-TC-224	p <sup>CN</sup>	N		.
42	LMTE-TC-225	p <sup>CN</sup>	P	28	I
43	LMTE-TC-227	p <sup>CN</sup>	P	29	I
44	LMTE-TC-262	p <sup>CN</sup>	N		.
45	LMTE-TC-263	p <sup>CN</sup>	P	30	I
46	LMTE-TC-264	p <sup>CN</sup>	N		.
47	LMTE-TC-265	p <sup>CN</sup>	P	31	I
48	LMTE-TC-266	p <sup>CN</sup>	N		.
49	LMTE-TC-267	p <sup>CN</sup>	P	32	I
50	LMTE-TC-272	p <sup>CN</sup>	P	33	I
51	LMTE-TC-274	p <sup>CN</sup>	P	34	I
52	LMTE-TC-277	N	N		.
53	LMTE-TC-278	p <sup>CN</sup>	N		.
54	LMTE-TC-279	p <sup>CN</sup>	N		.
55	LMTE-TC-286	p <sup>CN</sup>	N		.
56	LMTE-TC-291	p <sup>CN</sup>	P		.
57	LMTE-TC-310	N	N		.
58	LMTE-TC-317	p <sup>CN</sup>	P	35	I/II
59	LMTE-TC-325	p <sup>CN</sup>	P	36	I
60	LMTE-TC-330	p <sup>CN</sup>	P	37	I
61	LMTE-TC-365	p <sup>CN</sup>	N		.
62	LMTE-TC-366	p <sup>CN</sup>	P	38	I
63	LMTE-TC-374	p <sup>CN</sup>	P	39	I
64	LMTE-TC-386	p <sup>CN</sup>	N	40	I
65	LMTE-TC-395	p <sup>CN</sup>	P	41	I
66	LMTE-TC-404	p <sup>CN</sup>	P	42	I
67	LMTE-TC-418	p <sup>CN</sup>	N		.
68	LMTE-TC-419	p <sup>CN</sup>	P	43	I
69	LMTE-TC-420	p <sup>CN</sup>	N		.
70	LMTE-TC-423	N	N		.
71	LMTE-TC-424	N	N		.
72	LMTE-TC-425	p <sup>CN</sup>	N		.
73	LMTE-TC-426	N	N		.
74	LMTE-TC-427	N	N		.
75	LMTE-TC-428	p <sup>CN</sup>	P	44	I
76	LMTE-TC-429	N	N		.
77	LMTE-TC-430	N	N		.
78	LMTE-TC-431	p <sup>CN</sup>	N		.
79	LMTE-TC-436	N	N		.



80	LMTE-TC-437	N	N	45	.
81	LMTE-TC-438	N	N		.
82	LMTE-TC-439	p <sup>CN</sup>	P		I
83	LMTE-TC-440	N	N		.
84	LMTE-TC-441	N	N		.

*Nota.* P, Positivo; <sup>CN</sup>, Caso Nuevo; N, negativo. El punto que aparece en las diferentes columnas se refiere a que a esa muestra no se le realizó ese ensayo.

### 11.5 Distribución Geográfica

Se obtuvo la distribución geográfica de las DTU's de *T. cruzi* por estado que se muestra en la Tabla 20 y la Figura 24 respectivamente.

**Tabla 20**

*Distribución geográfica de las DTU's de Trypanosoma cruzi.* Los valores corresponden a frecuencias absolutas y frecuencias relativas o (%).

Estados	Linajes						Total
	TcI	TcIII	TcIV	TcI/II	TcI/III	TcI/IV	
Ciudad de México	1	0	0	0	0	0	
Guanajuato	1	0	0	0	0	0	
Querétaro	4	0	1	0	0	0	
Morelos	33	1	0	2	1	1	
<b>Total</b>	39(86.66 %)	1(2.22 %)	1(2.22 %)	2(4.44 %)	1(2.22 %)	1(2.22 %)	<b>45 (100 %)</b>

**Figura 22**

*Distribución geográfica de las DTU's identificadas.*



## 12. DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró identificar la presencia de los linajes genéticos de *T. cruzi* DTU's en muestras de voluntarios pertenecientes a la zona centro de México y el estado de Morelos. Por primera vez, se reporta la presencia de los linajes TcII, TcIII y TcIV para la región centro de México.

En cuanto a la evaluación de la PCR diagnóstico (PCR<sub>TcTr</sub>) para la detección de *T. cruzi*, se encontró que: a) mostró resultados positivos solo para esta especie, y b) no se encontró ningún resultado positivo para *T. rangeli* en las muestras analizadas (N=84). Esto se evaluó con una PCR (TcTr) que es capaz de detectar hasta 10 a 100 fg para ambas especies, de acuerdo a lo reportado por Fraga et al., 2014. Sin embargo, es importante mencionar que los resultados no corresponden con el reporte de alta prevalencia de casos de personas con infección mixta por *T. cruzi*/*T. rangeli* (Ramírez et al., 1998, Guhl et al., 2011). Estos resultados pudieron ser ocasionados por reacciones cruzadas o inespecíficas; ya que se ha demostrado que en diferentes PCR dirigidas a ADN del kinetoplasto, DNA satelitar nuclear repetido 195pb, la sub unidad ribosomal 24, ADN telomero (Strum et al., 1989; Vallejo et al., 1999; Breniere et al. 1993); entre otros, se obtienen bandas de amplificación similares de ambas especies (Fraga et al., 2014) en nuestro estudio solamente identificamos la presencia de *T. cruzi*. Aún así, se necesitan más estudios para poder concluir que *T. rangeli* (especie no patógena para los seres humanos) no se encuentre presente en parasitemias cruzadas en voluntarios de la zona centro de México.

La prevalencia de los voluntarios positivos con PCR dúplex fue del 72.61 % (61 de 84); este alto porcentaje se debe a que la población fue seleccionada bajo las siguientes especificaciones: 1) que perteneciera a una zona endémica y 2) que contara con alta probabilidad de padecer la enfermedad. Además de que algunas de las muestras seleccionadas contaban con un resultado serológico positivos previo, una PCR positiva previa o eran voluntarios que habían visto al Triatomino en su domicilio o, bien, contaban con la presencia de la picadura del mismo (Tabla 16).

Se carece hasta la fecha en México de algún indicador de prevalencia de la EC, obtenida a partir de análisis molecular tanto para población en general como para población con alta probabilidad de presentar la enfermedad, perteneciente a zona endémica. Esto se debe a que, de acuerdo al protocolo del Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México, emitido por la Secretaria de Salud en 2019, el principal método diagnóstico de la EC en nuestro país son los

métodos serológicos, mismos que se emplean en los laboratorios estatales para detectar la enfermedad (SSA, 2019).

De 61 muestras que se amplificaron con el sistema PCR<sub>TcTr</sub>, solo en el 74 % (45/61) se obtuvieron productos de amplificación con el sistema PCR<sub>DTU</sub>, esto posiblemente se deba a que este método de PCR es menos sensible que el sistema PCR<sub>TcTr</sub>. Este cociente obtenido del sistema Dual de PCR (PCR<sub>TcTr</sub> – PCR<sub>DTU</sub>) está acorde a lo observado en el análisis de muestras con este mismo sistema en pacientes de Colombia, Belice, Bolivia y Cuba (Fraga, 2019). El 100 % (n=45) de las muestras PCR<sub>DTU</sub> positivas (ver Tabla 20), previamente mostraron un resultado PCR<sub>TcTr</sub> positivo.

Un resultado PCR<sub>DTU</sub> negativo no invalida la primer PCR<sub>TcTr</sub> positiva. Como se mencionó, esta discordancia de resultados se deben a la baja sensibilidad de la PCR<sub>DTU</sub>, ya que esta segunda PCR está diseñada para identificar los linajes de *T. cruzi* y no se considera como una prueba confirmatoria (Fraga 2014).

Como se esperaba, el linaje con mayor prevalencia fue el linaje TcI, con un 39 %, ya que previamente se ha reportado una alta prevalencia de este linaje en toda América Latina, incluyendo a México (Brenière et al., 2016 y Jiménez et al., 2018). Mientras que TcIII y TcIV presentaron en cualquier caso una frecuencia del 2 %. Las infecciones mixtas en su conjunto presentaron una frecuencia del 8.88 % (4/45), asociadas a TcI/II (4.44 %), TcI/III (2.22 %) y TcI/IV (2.22 %).

En cuanto a la distribución de los linajes de *T. cruzi* en México, Boseno *et al.*, en el 2002, fue uno de los primeros estudios que dio a conocer la distribución de los DTU's, a partir de 16 muestras de origen humano reportando la presencia exclusivamente de TcI, mientras que años después Ángeles et al. (2016b), reportaron por primera ocasión, entre donadores de sangre humana, la presencia de material genético de TcI y de TcII donde el 35 % de las muestras que analizaron fueron infecciones mixtas (TcI/TcII), aunque cabe resaltar que la técnica que utilizó Ángeles et al. (2016b), no era capaz de distinguir entre los otros 5 linajes.

En cuanto a la distribución geográfica de los linajes obtenidos (Tabla 19), en el caso del estado de Morelos, el 73.3 % correspondió al linaje TcI, mientras que el 8.8 % fue para las infecciones mixtas TcI/II(4.4%), TcI/III (2.2 %) y TcI/IV (2.2 %). Para el estado de Querétaro, se encontró que el 8.8 % fue para TcI y el 2.2 % para TcIV, respectivamente, mientras que Guanajuato y la CDMex, al contar con una sola muestra, en ambos casos correspondió al 2.2 % de TcI respectivamente.

Por otra parte, recientemente, una de las publicaciones en donde se reportan los linajes de *T. cruzi* en México es el de Villanueva-Lizama et al. (2019), donde dieron a conocer la presencia de los

linajes TcI, TcII, TcV y TcVI en 16 muestras serológicamente reactivas en el sureste mexicano (Yucatán), con un 52 % de infecciones mixtas respectivamente, frecuencia que supera el valor reportado por Ángeles et al., 2016b (35.8%) y los hallazgos del presente reporte (8.84%). Esta discrepancia, posiblemente esté relacionada a los grupos muestrales analizados en cada reporte y a las diferencias poblacionales asociadas entre el sureste mexicano y la región centro del país, esto incluye la probable exposición a más de una picadura o bien que se encuentren varios linajes de *T. cruzi* en el Triatomino que causa la picadura. (Villanueva-Lizama et al., 2019). A simismo, en la Figura 25, se combina la distribución geográfica identificada por Patterson y Guhl. (2010), así como la reportada por Villanueva-Lizama et al. (2019) y la reportada en este trabajo de investigación. En los estudios de Patterson y Guhl (2010), se muestra una principal distribución de TcI en la zona centro y sur de México; la distribución coincide con lo reportado en nuestro estudio. En cuanto al trabajo de Villanueva-Lizama et al. (2019), todos los linajes que encontraron se centran en el estado de Yucatán. En cualquier caso, el presente reporte contribuye a tener un panorama más claro sobre la distribución de los linajes de *T. cruzi*, desde TcI hasta TcVI y las infecciones mixtas para el Occidente, Centro y Sureste de México.

En otros estudios, también se menciona la presencia de los linajes TcI y TcII para la zona centro de México, sin embargo, estos estudios fueron realizados por medio de una técnica de Inmunofenotipificación por medio de técnicas de Western blot con antígenos TSSA, y, si bien, se menciona la presencia de los linajes TcI y TcII para la zona centro y sur de México, no se mencionan los estados de la república en los cuales se encontró la presencia de estos linajes (Risso et al., 2011). Adicionalmente, el estudio de la distribución geográfica de las DTU's de *T. cruzi* en América ha sido abordado por diferentes grupos de investigación, donde se ha incluido la investigación no solo en muestras humanas, sino también en reservorios, vectores y primates no humanos (Falla et al., 2009; Herrera et al., 2009; Llewellyn et al., 2009; Cura et al., 2010; Patterson y Guhl, 2010; Bern et al., 2011 y Pronovost et al., 2019), donde el linaje más reportado y ampliamente distribuido es TcI.

**Figura 25**

*Nueva distribución geográfica de las DTU's identificadas en México.*



*Nota.* Distribución geográfica de las DTU's reportadas para México, donde se incluyen las muestras analizadas en este estudio para Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México y Morelos. Además se incluyen las ya reportadas por Patterson y Guhl (2010) y las del estado de Yucatán reportadas por Villanueva-Lizama *et al.* (2019).

De manera complementaria investigaciones realizadas por el grupo de Investigación del LMTE, demostraron que las pruebas serológicas no son suficientes para determinar la positividad por infección por *T. cruzi*, debido en que al comparar los resultados obtenidos de las pruebas de PCR<sub>TcTr</sub> con los resultados serológicos de las muestras analizadas se obtuvo que 47 (55.95%) n=84, fueron serológicamente negativas, PCR positiva. Existe evidencia de muestras de pacientes con resultados de ensayo PCR positivo y serología negativa que datan desde la década de los 90 en Sudamérica incluidos México. (Gomes et al., 1998; Salomone et al., 2003; Blum-Domínguez et al., 2011; Ángeles et al., 2016a). Sin embargo se necesitan más estudios al respecto y este resultado

solo es complementario a los datos aquí obtenidos.

Finalmente, la importancia de esta característica de las pruebas diagnósticas existentes radica en que, en México, la mayor parte de los reportes de la EC se llevan a cabo por detección serológica, de acuerdo a lo especificado por la SSA. De acuerdo con la revisión del comportamiento epidemiológico de la tasa de incidencia acumulada 2000-2020 (ver Figura 3), Morelos se ubicó en el 2do lugar nacional con una tasa de incidencia de 2.41 por cada 100 000 habitantes (DGE, 2021). Muchos de los reportes que soportan esta estadística provienen de los Bancos de Donación de Sangre Humana, donde se hace el diagnóstico serológico de la enfermedad de manera rutinaria a los candidatos a donantes, motivo por el cual se hace hincapié en la importancia de incluir a los métodos moleculares como método diagnóstico usual de la enfermedad. Además, la manera en que se almacenan los componentes sanguíneos en los bancos de sangre, permite la supervivencia del parásito y esto aumenta el riesgo de contraer la enfermedad por medio de transfusiones sanguíneas.

### **13. CONCLUSIONES**

1. TcI fue el linaje con mayor frecuencia encontrado para los estados analizados del centro de México (Querétaro Guanajuato, Ciudad de México y Morelos).
2. Se reportó la presencia de las siguientes infecciones mixtas: TcI/II, TcI/III, y TcI/IV.
3. Por primera vez, se reportó la presencia de los linajes TcIII y TcIV para la zona centro de México.

#### **14. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**



El estudio de los linajes se limita a los grupos de investigación que trabajan con la enfermedad de Chagas, que se encuentran distribuidos de manera no homogénea en todo el país, esto limita las investigaciones a estados de la República Mexicana en los que se desarrollan este tipo de proyectos, observándose así reportes de áreas geográficas limitadas y en consecuencia un número limitado de muestras, tal como puede observarse en esta investigación.

Aunado a esto, el hecho de trabajar con muestras humanas implica que se tienen que tomar en cuenta un alto número de consideraciones éticas que salvaguarden los derechos a la salud, la privacidad y a la integridad de los participantes de este tipo de estudios, lo que limita aún más la obtención de muestras sanguíneas con las cuales llevar a cabo este tipo de investigaciones.

Otras limitantes para desarrollar este tipo de trabajos, son los costos que implica la investigación misma, donde están relacionados los costes de equipos y reactivos utilizados dentro de cada una de las pruebas realizadas.

## **15. PERSPECTIVAS**

1. Evaluar la detección de linajes en una muestra más grande que sea capaz de representar de forma estadísticamente significativa la frecuencia de cada una de las DTU's para personas diagnosticadas en la zona centro de México.
2. Realizar un análisis de secuenciación para observar si se encuentra alguna variación intralínea de los linajes identificados hasta el momento.
3. Establecer una técnica de detección molecular de PCR tiempo real basado en la HSP70 que sea capaz de detectar los linajes de una manera más eficiente.

## 16. REFERENCIAS

- Ángeles, C. J., Santa, O. J., Acevedo, F. J.,... (2013). Estandarización de un procedimiento por PCR para la detección del *Trypanosoma cruzi* en disponente de sangre humana, serológicamente negativos. Memorias de la IX Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional 2013. Palacio de convenciones. La Habana, Cuba.
- Ángeles, J. S., Monroy, A. S., Garduño, C., Peña, C., Lara, M. B. y Herrera, A. (2016a). Detección de la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos con antecedentes de punción por *Triatoma* spp en el estado de Morelos, México. *Blood Transfusion*, 14(4), P-145.
- Ángeles, J., Monroy, A. y Garduño, C. (2016b). Detección del linaje TC-II de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre humana del estado de Morelos, México. *Blood Transfusion*, 14(4), OS-25.
- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C., y Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), e0006859.
- Ávila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., Paiva, E., Degraive, W. & Simpson, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2421–6.
- Bastidas, K. L. (2018). *PCR dúplex para la confirmación de la infección por tripanosoma cruzi mediante el gen Hsp70* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México].
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655–681. doi: 10.1128/CMR.00005-11

- Blum-Domínguez, S., Espinoza, B., Martínez-Martínez, I., Maldonado-Velázquez, G. y Tamay-Segovia, P. (2011). Hallazgo de infección por *Trypanosoma cruzi* sin evidencia serológica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 49(5), 537–539.
- Bosseno, M., Kasten, F. L., Ramsey, J., y Espinoza, B. (2001). Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in México. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(2), 627–632.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), 1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0004792
- Brisse, S., Barnabé, C., y Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, 30(1), 35–44.
- Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., ... Schijman, A. G. (2010). Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 485–495.
- Canil, M. S. (2011) Determinación de causas de aparición de nuevos casos de Enfermedad de Chagas en niños de 0-14 años en zona endémica con corte de transmisión vectorial [Tesis de grado, Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Córdoba].
- Cancino-Faure, M. B. (2016). Transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas. Estudio de la carga parasitaria y viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en los componentes sanguíneos y valoración de métodos de reducción de patógenos mediante herramientas moleculares [Tesis de Doctoral, Facultat de Farmacia Departament de Biologia, Sanitat I Medi Ambient Laboratori de Parasitologia, Barcelona].
- Castro, A., Luquetti, A., Rassi, A., Rassi, G., Chiari, E., & Galvão, L. (2002). Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 88(10), 894–900. doi:10.1007/s00436-002-0679-3

- Carrada-Bravo, T. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 51(4), 205–219.
- Center for Disease Control and Prevention (6 de marzo de 2019) Parasites American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
- Cura, C. I., Duffy, T., Lucero, R. H., Bisio, M., Péneau, J., Jiménez-Coello, M., ... Schijman, A. G. (2015). Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003765>
- Cura, C., Mejía-Jaramillo, A., Duffy, T., Burgosa, J., Rodrigueroc, M., Cardinal, M., KJose, S., Gurgel-Gonçalves, R., Blanchet, D., De Pablos, L., Tomasini, N., Da Silve, A., Russomando, G., y Schijman, A. (2010). *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *Int J Parasitol. Author Manuscript*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Cura, C. y Schijman, A. G. (2013). Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de chagas. *Revista Española de Salud Pública*. 86, 9-16.
- Díaz, M. L., y González, C. I. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente Acute Chagas' disease: oral infection of *Trypanosoma cruzi* as a re-emerging transmission pathway. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, 46(2), 177-188.
- Dirección General de Epidemiología. (27 de enero de 2021). *Anuarios de Morbilidad 1984 a 2019*. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/anuarios-de-morbilidad-1984-2019>
- D'Ávila, D. A., Macedo, A. M., Valadares, H. M. S., Gontijo, E. D., De Castro, A. M., Machado, C. R., ... Galvão, L. M. C. (2009). Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi*

- during progression of the chronic phase in chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1718–1725.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 (9), 871-874.
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G. A., y Guhl, F. (2009). Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trópica*, 110(1), 15–21.
- Fraga, J., Fernández-Calienes, A., Montalvo, A. M., Maes, I., Dujardin, J. C., y Van der Auwera, G. (2014). Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Tropical Medicine and International Health*, 19(2), 195–206.
- Fraga, J., Fernández-Calienes, A., Montalvo, A. M., Maes, I., Deborggraeve, S., Büscher, P., ... Van der Auwera, G. (2016). Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 165–172.
- Fraga, J. (2019). Estrategia cubana para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Congreso Internacional de Vectores (Himéptera, Reduviidae, Triatominae) y de Trypanosoma cruzi: Panorama actual y Expectativas. 4, 5 y 6 de diciembre de 2019*. Campeche, Campeche, México.
- Garduño, C. (2013). Empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos clínicamente sanos. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos].
- Garduño, C. (2016). Identificación del Linaje de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del estado de Morelos. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].
- González, A., Prediger, E., Huecas M., Nogueira, N. y Lizardi, P. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 3356-3360.

- Gomes, M., Macedo, A., Vago, A. Pena, S., Galvao, L. y Chiari, E. (1998) *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. *Experimental parasitology*, 88, 28-33.
- Guhl, F., Duque, S., Herrera, C., Moreno, A., Nicholls, S. y Sánchez M. (2001) *Manual de procedimientos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas*. Universidad de los Andes, Centro de investigación en Microbiología y Parasitología Tropical.
- Guhl, F., & Ramírez, J. D. (2011). *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trópica*, 119(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>
- Herrera, C., Barges, M. D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G. A., y Guhl, F. (2007). Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4), 535–539.
- Herrera-Arellano, A., Ángeles-Chimal, J. S., Andrade-Almaraz, V., Santa-Olalla, J., González-Escobar, J. M., Garduño-Pineda, C., Monroy-Hicochea, A. S., Lara-Padilla, M. B., Bejar-Ramírez, Y. L., Juárez-Palma, L., y Gómez-Bravo, J. A., (2019). Occult Infection by *Trypanosoma cruzi* in Human Blood Donors of the Morelos. *Integrative Immunobiology and Vaccines*, 1 (1), 35-41.
- Herrera, C., Guhl, F., Falla, A., Fajardo, A., Montilla, M., Adolfo Vallejo, G., & Barges, M. D. (2009). Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *Journal of Parasitology Research*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2009/897364>
- Hernández-Becerril, N., Mejía, A. M., Ballinas-Verdugo, M. A., Garza-Murillo, V., Manilla-Toquero, E., López, R.,... Monteón, V. M. (2005). Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico City. Anti-*Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 111–116.

- Higuera, M. A. (2005). Diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre y suero por métodos serológicos y moleculares [Tesis de maestría, Bogotá, Colombia].
- Jiménez, P., Jaimes, J., Poveda, C., y Ramírez, J. D. (2018). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, *146*(3), 269.
- Khaw, M., & Panosian, C. B. (1995). Human antiprotozoal therapy: Past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, *8*(3), 427–439. <https://doi.org/10.1128/cmr.8.3.427>
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M.,... Teixeira, M. M. G. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trópica*, *151*(1), 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M.,... Gaunt, M. W. (2009). *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *3*(9), 6–8. doi:10.1371/journal.pntd.0000510
- Lozano-Kasten, F., Magallón-Gastélum, E., Soto-Gutiérrez, M., Kasten-Monges, M., Bosseno, M. F., y Brenière, S. F. (2008). Conocimiento epidemiológico y situación actual de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México. *Salud Pública de México*, *50*(6), 508–515.
- Marcili, A., Valente, V. C., Valente, S. A., et al., (2009). *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* *39*, 615–623
- Mexicana, R. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *51*(4), 205–219.



- Monroy, A. (2015). Diagnóstico molecular para la detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre seronegativos del estado de Morelos. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos].
- Patterson, J. S., & Guhl, F. (2010). *Geographical Distribution of Chagas Disease*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00005-8>
- Salazar-Schettino P.M., Bucio-Torresa, M.I., Bravo, M. C. Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E.A., Angélica, N., & Fernández-Santose, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 59(6), 6–16.
- Pérez-Molina, J. A. y Lancet I. M., (2018). Chagas disease. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 31(12), 30–33.
- Pronovost, H., Peterson, A. C., Chavez, B. G., Blum, M. J., Dumonteil, E., & Herrera, C. P. (2019). Deep sequencing reveals multiclonality and new discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in rodents from the southern United States. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1684-1182. doi: 10.1016/j.jmii.2018.12.004
- Portela-Lindoso, A., y Shikanai-Yasuda, M. (2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública*, 37 (1).
- Ramírez, C. J., Cura I., C., da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., ... Schijman A. G., (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*, 17(5), 605–615. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
- Ramsey J. M., R. O. (2000). Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de chagas en México. *Instituto Nacional de Salud Pública*, 85–103.

- Risso, G., Sartor, A., Burgos, M., Briceño, L., Rodríguez, E. ., Guhl, F., ... Leguizamón, M. S. (2011). Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), 78–84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0177>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., y González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*, 154(5), 605–612.
- Salazar-Schettino, P., Rojas Wastavino, G., Cabrera Bravo, M., Bucio Torres, M., Martínez Ibarra, J., Monroy Escobar, M., ... Torres Gutiérrez, E. (2010). A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57–80.
- Salomone, O. A., Basquiera, A. L., Sembaj, A., Aguerri, A. M., Reyes, M. E., Omelianuk, M., ... Madoery, R. J. (2003). *Trypanosoma cruzi* in Persons without Serologic Evidence of Disease, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 9(12), 1558–1562.
- Schmunis, G. A., y Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trópica*, 115(1–2), 14–21.
- Secretaría de Salud. (2019). *Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas en México*. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en Mexico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf)
- Secretaría de Salud. (2012). *NORMA Oficial Mexicana, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos*. (NOM-253-SSA1-2012). [cnts.salud.gob.mx/descargas/NOM-253-SSA1-2012.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/cnts.salud.gob.mx/descargas/NOM-253-SSA1-2012.pdf)
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., ... Grisard, E. C. (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(1), 25–32.

- 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. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33(3), 205–214.
- Ventura-García, L., Roura, M., Pell, C., Posada, E., Gascón, J., Aldasoro, E., ... Pool, R. (2013). Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9).
- Villanueva-Lizama, L., Teh-Poot, C., Majeau, A., Herrera, C., y Dumonteil, E. (2019). Molecular Genotyping of *Trypanosoma cruzi* by Next-Generation Sequencing of the Mini-Exon Gene Reveals Infections With Multiple Parasite Discrete Typing Units in Chagasic Patients From Yucatán, México. *The Journal of Infectious Diseases*, 219 (12), 1980–1988.
- Wincker, P., Britto, C., Cardoso, M. A., Morel, C. M., Bosseno, M. F., Brenière, S. F., & Yaksic, N. (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters*, 124(3), 419–423. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07318.x
- World Health Organization. (24 de mayo de 2019). World Chagas Disease Day: raising awareness of neglected tropical disease. The 72nd World Health Assembly today approved the designation of a World Chagas Disease Day. [https://www.who.int/neglected\\_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/)
- World Health Organization. (2002). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee (905). <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>
- World Health Organization. (08 de noviembre de 2010). Global Health Observatory Map Gallery. <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbel D. A., Chiari, E., Fernandes, O., ... 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), 1051-54.

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



## 17. ANEXOS

### Carta de Consentimiento Informado

**Esta carta de consentimiento informado puede contener palabras que usted no entienda. Por favor solicite al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no entienda con claridad.**

Por medio de la presente, yo \_\_\_\_\_ acepto participar en el proyecto de investigación: **“Desarrollo de métodos más sensibles para el diagnóstico confirmatorio de la Enfermedad de Chagas”**, estudio observacional, registrado ante el Comité Local de Ética en Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con el reglamento de la La ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo “De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos”, Capítulo I, Artículos 13 y 14. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Asimismo, de acuerdo a los criterios establecidos en el artículo 17 de dicho reglamento esta investigación se consideró de riesgo mínimo y atendiendo a los aspectos mencionados en el Artículo 21 del mismo reglamento se informó al sujeto de estudio lo siguiente:

Se me ha explicado que, **a solicitud de un médico especialista y de manera gratuita**, o por mi propia voluntad y solicitud, el personal académico del Laboratorio de Investigación en Tripanosomiasis Americana del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, o de las Instituciones colaboradoras de este protocolo, realizarán el diagnóstico de infección con *Trypanosoma cruzi* por métodos serológicos y/o moleculares en una muestra de mi sangre. Para ello se tomarán 4 tubos de 5 ml de sangre venosa de mi brazo, por medio de una aguja de calibre 23G y un tubo Vacutainer© con capacidad de 6 ml (en caso de ser menor de edad, solo se tomarán dos tubos). La toma de esta muestra no representa un riesgo a mi salud, pues se realizará en condiciones de asepsia, utilizando material nuevo, estéril y desechable, que se abrirá por primera

vez en mi presencia. Se me ha informado que como resultado del uso de agujas podrían presentarse moretones o sangrados ligeros, pero estas molestias serán mínimas pues la muestra será tomada por una persona calificada para ello.

Se me ha aclarado que la muestra tomada es suficiente para realizar el diagnóstico solicitado por el médico o por mi propia voluntad y solicitud, y que podría quedar una parte de ella que se usaría para fines de investigación, en el desarrollo y mejoramiento de pruebas de diagnóstico, estudios epidemiológicos, purificación de anticuerpos y otras relacionadas con muestras sanguíneas humanas.

También se me ha informado que se me entregará un documento en el cual estará impreso el resultado de diagnóstico, quedando en manos de mi médico tratante o de mi institución de salud el seguimiento, estudios complementarios y/o tratamientos requeridos. Asimismo, se tomarán diversos datos sobre mi estado de salud y mi conocimiento de esta enfermedad y su vector transmisor, en un cuestionario *ad hoc*, que podrían ser utilizados con fines estadísticos y epidemiológicos que contribuyan al conocimiento de la Enfermedad de Chagas en México. Se me ha garantizado que en todo momento mis datos personales y mi resultado del diagnóstico serán manejados de manera confidencial, tanto en la publicación de resultados de investigación como en presentaciones ante la comunidad académica.

Con fecha \_\_\_\_\_, una vez que se aclararon todas mis dudas respecto al estudio diagnóstico que me será realizado, acepto que mi muestra de sangre y los datos recabados en el cuestionario respectivo, sean utilizados para fines de investigación en el proyecto “Desarrollo de métodos más sensibles para el diagnóstico confirmatorio de la Enfermedad de Chagas”, así como en las publicaciones derivadas del mismo, siempre y cuando se respete la confidencialidad de mis datos personales. Asimismo, me queda claro que mi consentimiento no es condicionante para la realización del diagnóstico solicitado.

Se me ha notificado que mi participación en este estudio es voluntaria. Si decido cambiar de parecer y renunciar en cualquier momento, en este caso deberé de notificarlo por escrito al investigador principal, sin sanciones ni pérdida de beneficios al respecto de mi atención futura en el marco de este protocolo. El investigador principal y/o el investigador asociado, pueden retirarme del estudio en cualquier momento, notificándome esta situación por escrito. Entre las causas se enuncian pero no se limita a las siguientes: Si se encuentra que la cantidad de sangre extraída es muy poca para la prueba, si sufre hemólisis o se encuentra lipémica.

---

Nombre y firma del paciente o responsable legal

---

Nombre y firma del testigo

Relación que guarda con el paciente: \_\_\_\_\_

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Investigador

---

Nombre y firma Investigador

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador. Asimismo, de acuerdo con el artículo 21 del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la firma y dirección de los testigos no es indispensable para este estudio considerado de riesgo mínimo.



## Cuestionario de la Enfermedad de Chagas

### I. IDENTIFICACIÓN Y PROCEDENCIA

Folio: \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Nombre:

\_\_\_\_\_

apellido paterno

apellido materno

nombre(s)

Edad: \_\_\_\_\_ años      Sexo: Másc. \_\_\_ Fem. \_\_\_      Ocupación:

\_\_\_\_\_

Años de estudios concluídos: \_\_\_\_\_

Si la ocupación es “hogar”, indicar la actividad que realiza:

\_\_\_\_\_

Si es estudiante, especificar tipo de estudios:

\_\_\_\_\_

Semestre, trimestre, etc. que cursa actualmente:

\_\_\_\_\_

Estado civil: soltero \_\_\_ casado \_\_\_ divorciado(a) \_\_\_ unión libre \_\_\_

Originario de: \_\_\_\_\_ tiempo

\_\_\_\_\_

Domicilio actual \_\_\_\_\_ tiempo

\_\_\_\_\_

Calle

Núm.

Colonia: \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Estado

\_\_\_\_\_

Código Postal \_\_\_\_\_ Teléfono casa: \_\_\_\_\_ Teléfono

celular: \_\_\_\_\_

Correo electrónico: \_\_\_\_\_

Viene referido por:

\_\_\_\_\_



**II. INFORMACIÓN DE LA (S) PERSONA (S) QUE HABITA(n)  
ACTUALMENTE LA VIVIENDA**

Clave	Nombre y apellidos	Parentesco	Edad	Sexo H/M	Escolaridad	Oficio

**III. ANTECEDENTES NO PATOLÓGICOS**

¿Conoce al vector? \_\_\_ ¿Con qué nombre? \_\_\_\_\_

Lo ha visto en: su comunidad \_\_\_\_, su casa \_\_\_\_, su cama \_\_\_\_, sus paredes \_\_\_\_, otro \_\_\_\_\_

¿Le ha picado? \_\_\_ ¿Hace cuánto tiempo? \_\_\_\_\_ ¿Cuántas veces? \_\_\_\_\_

Le pico en brazos \_\_\_\_, piernas \_\_\_\_, cara \_\_\_\_, espalda \_\_\_\_, otro \_\_\_\_\_

**III.1 La casa que habitó durante la infancia tenía:**

Techo de palma \_\_\_\_, teja \_\_\_\_, madera \_\_\_\_, cemento \_\_\_\_, otro \_\_\_\_\_

Piso de tierra \_\_\_\_, cemento \_\_\_\_, madera \_\_\_\_, azulejo \_\_\_\_, otro \_\_\_\_\_

Paredes de palma \_\_\_\_, varejón \_\_\_\_, madera \_\_\_\_, cemento \_\_\_\_, otro \_\_\_\_\_

Compartida con \_\_\_\_\_ personas más. De ellas \_\_\_\_\_ eran niños.

Animales cerca o dentro de la casa: Núm. \_\_, perros \_\_, gatos \_\_, gallinas \_\_, borregos \_\_, vacas \_\_, cerdos \_\_, otros \_\_\_\_\_

Servicio Sanitario: Letrina \_\_, Fosa séptica \_\_, Baño \_\_, Drenaje \_\_

¿Áreas verdes aledañas? \_\_\_\_, ¿De qué tipo?

---

### III.2 Su domicilio actual tiene:

Techo de palma \_\_, teja \_\_, madera \_\_, cemento \_\_, otro \_\_\_\_\_

Piso de tierra \_\_, cemento \_\_, madera \_\_, azulejo \_\_, otro \_\_\_\_\_

Paredes de palma \_\_, varejón \_\_, madera \_\_, cemento \_\_, otro \_\_\_\_\_

Animales cerca o dentro de la casa: Núm. \_\_, perros \_\_, gatos \_\_, gallinas \_\_, borregos \_\_, vacas \_\_, cerdos \_\_, otros \_\_\_\_\_

Personas mayores de 12 AÑOS \_\_\_\_ Personas menores de 12 años \_\_\_\_

Trabajan \_\_\_\_ de ellas en

---

Servicio Sanitario: Letrina \_\_, Fosa séptica \_\_, Baño \_\_, Drenaje \_\_

¿Áreas verdes aledañas? \_\_\_\_, ¿De qué tipo?

---

### IV. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

¿Chagoma? \_\_ Hace \_\_\_\_\_ ¿Signo de romaña? \_\_ Hace \_\_\_\_\_

¿Palpitaciones (taquicardia)? \_\_ Hace \_\_\_\_\_ ¿Fatiga al caminar? \_\_ Hace \_\_\_\_\_

¿Estreñimientos frecuentes? \_\_ Hace \_\_\_\_\_ ¿Dolor en el pecho? \_\_ Hace \_\_\_\_\_

¿Regurgitaciones frecuentes? \_\_ Hace \_\_\_\_\_ ¿Mala deglución? \_\_ Hace \_\_\_\_\_

¿De dónde es originaria su madre? \_\_\_\_\_ ¿y su abuela materna? \_\_\_\_\_

¿En su familia ha habido casos de cardiopatías? \_\_ ¿de qué tipo?

---

¿Qué parentesco tiene el paciente cardiópata con usted?

\_\_\_\_\_

## V. ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS (MUJERES)

Número de gestas \_\_\_\_ ¿A qué edad? \_\_\_\_\_ ¿Cuántas por parto normal? \_\_\_\_ ¿Cuántas por cesárea? \_\_\_\_ ¿Abortos? \_\_\_\_ ¿A qué edad gestacional?

\_\_\_\_\_

¿Amamanto a sus hijos? \_\_\_\_ ¿Durante cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

## VI. FACTORES DE ALTO RIESGO

¿Estancias fuera de la localidad de residencia? \_\_\_\_ ¿Dónde?

\_\_\_\_\_

¿Ha practicado alguna vez campamentos que involucren dormir al aire libre o cerca de áreas silvestres? \_\_\_\_ ¿En qué año y lugar?

\_\_\_\_\_

¿Ha vivido en un estado de la república diferente a aquellos de nacimiento y residencia actual? \_\_\_\_ ¿Dónde y por cuánto tiempo?

\_\_\_\_\_

¿Le han practicado alguna cirugía o trasplante? \_\_\_\_ ¿De qué tipo? \_\_\_\_\_

¿En qué año e institución?

\_\_\_\_\_

¿Es paciente diabético? \_\_\_\_ ¿Qué diagnóstico tiene? \_\_\_\_\_

¿Le han diagnosticado alguna enfermedad infecciosa o parasitosis? \_\_\_\_ ¿Cuál?

\_\_\_\_\_

¿Le han transfundido sangre o sus derivados alguna vez? \_\_\_\_ ¿En qué año e institución? \_\_\_\_\_

¿Ha donado sangre? \_\_\_\_ ¿En qué fecha y lugar fue su última donación?

\_\_\_\_\_

Donaciones anteriores: Año \_\_\_\_\_ institución

\_\_\_\_\_

Año \_\_\_\_\_

institución

¿Come carne cruda? \_\_\_\_ ¿Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ ¿Hace cuánto?

\_\_\_\_\_

¿Toma leche cruda? \_\_\_\_ ¿Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ ¿Hace cuánto?

\_\_\_\_\_

## VII. ANTECEDENTES CARDIOLÓGICOS

¿El paciente presenta algún estudio electrocardiográfico? \_\_\_\_\_

EKG \_\_\_\_ Elaborado en \_\_\_\_\_ Dx.

\_\_\_\_\_

Placa de tórax \_\_\_\_ Elaborado en \_\_\_\_\_ Dx.

\_\_\_\_\_

## VIII. OBSERVACIONES: (ANOTAR TODOS LOS DATOS RELEVANTES SOBRE EL MOTIVO DE LA INCORPORACIÓN AL ESTUDIO).

Se me ha informado que los datos aquí compilados serán manejados confidencialmente, de acuerdo al formato de CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO que se anexa.

_____ Participante Nombre y firma	_____ Realiza entrevista Nombre y firma
---	---

**En caso de ser menor de edad se requiere la firma del padre o tutor legal.**

\_\_\_\_\_  
Padre, tutor o representante legal  
Nombre y firma



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 07 de agosto de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora  
Facultad de Medicina  
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Itzel Amairani Gutiérrez Reyna. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz**

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ** | Fecha:2021-10-05 15:57:28 | Firmante  
e58abkx5XilMv/FkcXYvKvW2/U5OyatzZxfpgCDlrU1wtR7ND17MfdBxBCTAYqUbSbH+atkHmMAeVgu9pNSxjcYtrjoatXbSwEm+PCdzrwC6/EHZlqpDvAcfGiwGJwGcOt/BadtWz  
0GKSj4fVIRKbSijHBFxhmTaxAUc:11vrhWcdUf4lLH9AaU8jVDWV8B750W5sz2l3ZuMQFmOyS77LKW564yhJqO6F4Y76ndj/uGuMuM3gmb4oLeX33FaHjb5JYiQgS5JqXFf4KAa  
wDeJKs9QriOPluQ88g9TARbR2qh/sBNJSwkoW8i9Gd7etedQwFDNIF1kTDommtZyiw=-

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



tXeJObGVc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Z69fKLRKc3kTz92vAb8ftHjSokUnHi80>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



## FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 07 de agosto de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora  
Facultad de Medicina  
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Itzel Amairani Gutiérrez Reyna. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dra. Luz María González Robledo**

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**LUZ MARIA GONZALEZ ROBLEDO** | Fecha:2021-10-05 16:29:37 | Firmante  
TTMKr3PYkyc70jgeE8IbFYBNVOvN08q3SirYWF0cydQan8V+SP3qq5kHtmFZloth7ODJNkPIEK7MQUQ3A/D0BcJ1xMwppqWZbz4IlhDalF1ZyetaPhRG+0xv8U8AgDBfneVvG0F+T9r2SnidwOBYpmeLb+5p816R/LKWOB8SPULMPJIZMuinmMVHzoQYg4QrCGQw/D7ZSTICAMTUlgZ5FjRbik/Rj2i+WdJgPCXujrSV0DecONfoh3y44P7955HTV+q7YU3afMtedHL4UKPY8+7Xtn3BO4ZzjvLG5gBHGqilMuyXuSlrCre3Dg0+JVcsQgAESIV8pGPHi34D8rqtPlg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Jolaw0Rr4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QT9aBvyjguqnXVDZccqRe5teJcq6Shou>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Cuernavaca, Mor., 07 de agosto de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora  
Facultad de Medicina  
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Itzel Amairani Gutiérrez Reyna. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dra. María Elena Villagrán Herrera**



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**MARÍA ELENA VILLAGRÁN HERRERA** | Fecha:2021-10-05 16:00:48 | Firmante  
fHT+vY5b0jh6ITZS2n39pwoLPRFLkmRTCEUwflLeg4jLe631p+GWAZ+YWYVowNlxDtKdmKEITl8w2oTMCqH+OPo2Bdw8UuuX9TMs3cbKozgEjvyGZ7PVyxOhEibUN+fnQLGw  
Ki6SbmPOOqplLxsmN0q3lGyUfFkuyhf13QgU3McG/FUBPj4UWfDhwhOkZjnlidY3oXqfADyYtGU7g8HvDVwABnSe7lZhpinoRFX3FMxXdWW2MyoPXi+oW0y3tiew0C7H+YSdXX  
P1uFXMf82F9vZqhoRVLTPb7fk5/x1Bb+MGTEUMxRaP5OsXFrjH+M+A4BxwchEFAYt8VW5JbweHg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MC1TcJfaW

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/n8JOfz5eLk0v8UQQgzYxn3NIKHEWFGh>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



**FACULTAD DE MEDICINA**

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 07 de agosto de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora  
Facultad de Medicina  
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Itzel Amairani Gutiérrez Reyna. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Armando Herrera Arellano**

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**ARMANDO HERRERA ARELLANO** | Fecha: 2021-10-05 19:48:47 | Firmante  
HkmNH+QAZmliXfNZAQlqM8LKkOim/Ho4Q0TJQMulx2EGUCO8BafK5EszXBazwQaj4aGCgJQls5ipvJ5l9gkZUAKq5cW1HNHYBjnYmQkMcW+xCkdrjmRjFwTJywapDpi0gggFX  
beewkF6BR/kveEHMoXzwRE69rtITlbaKc9nHVZxPByz2H7x3NKrvYUa1r2UmpbRQ4IMzKlbJyyuYG0nPPiWUYg/g7vS91jAEv6MUJi0Ahlqj5yd7qZQfjdYrR7Yd5dkphScrwzeaF  
uXonLn6Z1ASdO9AFEDkt+3/q0wO6dR9C3n6HzGfTT7QNPfEK1RslxkdDjvdx8haS8CEuA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[EuCrZogF8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/g4Uulki0Px3E93TcCnr3xtZDVuGjzwoU>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023