



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Tesis de Licenciatura en Biología



Diseño de marcadores moleculares para discriminar linajes genéticos de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas

Tesis presentada para cumplir con los requisitos finales para la obtención del **título profesional de Biólogo**

Presenta

Lynneth Rivas García

Director

Dr. Carlos Alberto Flores López

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DISEÑO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DISCRIMINAR LINAJES
GENÉTICOS DE *Trypanosoma cruzi*, EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

LYNNETH RIVAS GARCÍA

APROBADO POR



DR. CARLOS A. FLORES LÓPEZ

DIRECTOR



DR. M. ALEJANDRO CARBALLO AMADOR

SECRETARIO



DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR

SINODAL

Ensenada B.C. A 4 de junio de 2019

Asunto: Voto aprobatorio

Lynneth Rivas García

Presente

Por este conducto le informo a usted que después de haber leído su trabajo de tesis titulado: DISEÑO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DISCRIMINAR LINAJES GENÉTICOS DE *Trypanosoma cruzi*, EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, considero que cumple con los requisitos necesarios para aprobar la fase escrita de su examen profesional.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier aclaración.

Atentamente



DR. CARLOS ALBERTO FLORES LÓPEZ

PRESIDENTE

Ensenada B.C. A 4 de junio de 2019

Asunto: Voto aprobatorio

Lynneth Rivas García

Presente

Por este conducto le informo a usted que después de haber leído su trabajo de tesis titulado: DISEÑO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DISCRIMINAR LINAJES GENÉTICOS DE *Trypanosoma cruzi*, EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, considero que cumple con los requisitos necesarios para aprobar la fase escrita de su examen profesional.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier aclaración.

Atentamente



DR. MANUEL ALEJANDRO CARBALLO AMADOR

SECRETARIO

Ensenada B.C. A 4 de junio de 2019

Asunto: Voto aprobatorio

Lynneth Rivas García

Presente

Por este conducto le informo a usted que después de haber leído su trabajo de tesis titulado: DISEÑO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DISCRIMINAR LINAJES GENÉTICOS DE *Trypanosoma cruzi*, EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, considero que cumple con los requisitos necesarios para aprobar la fase escrita de su examen profesional.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier aclaración.

Atentamente



DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR

SINODAL

Resumen

El protozooario intracelular flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente patógeno perteneciente al orden Kinetoplastida, que ocasiona la zoonótica enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, el cual mata aproximadamente a 6 – 8 millones de personas por año a nivel global. El parásito es actualmente clasificado en seis distintos linajes o unidades de tipificación discreta (DTU), aunque estudios filogenéticos han demostrado que realmente son solamente 3 – 4 linajes monofiléticos, los cuales son imposibles de diferenciar a nivel morfológico. En suma, tradicionalmente se diagnostica a través de serologías, las cuales no son conclusivas en todos los escenarios clínicos, por lo que es fuertemente recomendable realizar diagnósticos con herramientas moleculares, ya que éstas son más sensibles y de mayor especificidad, para determinar de mejor manera los linajes genéticos. El objetivo de este estudio fue diseñar marcadores moleculares específicos para el parásito en cuestión, con la resolución necesaria para discriminar entre los linajes genéticos.

Se diseñaron 15 pares de cebadores que amplificaban 15 loci nucleares, sin embargo, solamente 12 amplificaron exitosamente. De ellos, hubo cuatro pares que tenían suficientes polimorfismos necesarios para distinguir los linajes genéticos del parásito vía una digestión enzimática, a partir de muestras silvestres y de cultivo de ADN. Finalmente, se propone el uso de tres pares de cebadores como los más efectivos en la caracterización y funcionalidad de los mismos, con los que se determinó que son necesarias al menos tres enzimas restrictivas de las ocho sugeridas para poder discriminar entre linajes genéticos de la enfermedad.

Al realizar una comparación con otros marcadores moleculares diseñados recientemente por otros autores, se logra demostrar el beneficio que tendría comenzar a utilizar los oligonucleótidos propuestos en este estudio.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, DTU, linajes, marcadores moleculares, enzimas de restricción.

Summary

The flagellated intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi* is the pathogen of the order Kinetoplastida, which causes the zoonotic Chagas disease or American trypanosomiasis, which kills 6 – 8 million people each year worldwide. The parasite is currently classified in six lineages or Discrete Typing Units (DTU), although phylogenetic studies have demonstrated that they are only 3 – 4 monophyletic lineages in reality, which are impossible to distinguish in a morphological level. To sum up, traditionally have been diagnosed through serologies, which are not conclusive in every clinical scenario, so it is strongly advisable to make diagnoses with molecular tools, since these are more sensitive and more specific, to determine in a better way the genetic lineages. The objective of this study was to design specific molecular markers for such parasite, with the required resolution to distinguish in between the genetic lineages.

15 pairs of primers were designed that amplified 15 nuclear loci however, only 12 amplified successfully. Among these, there were four pairs that had enough polymorphisms, to distinguish the protozoan lineages of the parasite via an enzymatic digestion, from wild samples and DNA culture samples. Finally, the use of three pairs of primers is proposed to be the most effective in the characterization and functionality of these, with which it was determined that at least three restrictive enzymes of the eight suggested are necessary to be able to discriminate the genetic lineages of the disease. By comparing with other recently designed molecular markers by other authors, it is possible to demonstrate the benefit of starting to use the oligonucleotides proposed in this study.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, DTU, lineages, molecular markers, restriction enzymes.

Dedicatoria

A mis padres, quienes han sembrado la semilla de la superación en mí, por su apoyo y amor que en todo momento me han dado.

Gracias.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y culminación de este trabajo. Primero, quiero agradecer a mi mentor, al Dr. Carlos A. Flores por guiarme durante la travesía que conlleva realizar una tesis, por introducirme al mundo de la investigación y apoyarme de manera personal e institucional en mi crecimiento profesional. Le estoy enormemente agradecida.

De igual modo quiero reconocer al Dr. Alejandro Carballo, por el apoyo académico y ayuda en todo momento, gracias. A la Dra. Raquel Muñiz por su exigencia como sínodo y sus enriquecedores comentarios de retroalimentación. También a CONACyT por posibilitar este estudio por medio de la beca No. 26029 y a UABC por abrirme sus puertas.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y experiencias durante y fuera de clase, a lo largo de la carrera. A mis compañeros más preciados, quienes durante el trayecto se volvieron buenos amigos, los tesoros de estos años, Ana, Selma, Irak y Mariana, cada uno estuvo conmigo en diferentes etapas, todas distintas pero muy apreciadas, los quiero mucho.

Igualmente agradeceré a mi mejor amigo, Fernando David por su comprensión, compañía e impulso. También a Max Ochoa, quien me brinda un apoyo infinito al estar siempre dispuesto, creer en mí, dar tan sabios consejos y por ayudarme a crecer.

Particularmente quiero agradecer a mi familia, quienes entendieron que a veces hay que ausentarse para cumplir una meta. Gracias por preocuparse y amenizar cada posible momento.

Glosario

AAP: Clave para amplicón del gen tipo permeasa para amino ácidos.

Algoritmo *muscle*: Alineamiento múltiple de secuencias por log-esperanza múltiple o en inglés *Multiple sequence alignment by log-expectation*.

AMT: Clave para amplicón del gen implicado en transporte de amonio.

AT: Parámetro referente al contenido porcentual para los pares de adeninas y timinas.

AVAD: Acrónimo para *Años de vida ajustados por discapacidad*.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local o por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*.

Bp: Pares de bases.

CBS: Clave para amplicón del gen Cistationina- β -sintasa.

CGL1: Clave para amplicón del gen Cistationina- γ -liasa.

CGL2: Clave para el segundo amplicón diseñado con el gen Cistationina- γ -liasa.

DA1: Clave para amplicón del gen Diacilglicerol aciltransferasa.

DA2: Clave para el segundo amplicón diseñado con el gen Diacilglicerol aciltransferasa.

DEPC: Pirocarbonato de dietilo o por su abreviación en inglés Diethylpyrocarbonate. Siendo agua libre de nucleasas, debido a su modo de preparación; el cual incluye al compuesto químico.

dNTP: Trifosfato de nucleósido y deoxyribonucleotide triphosphate en inglés.

DTU: Unidades discretas de tipificación, acrónimo inglés para *Discrete Typing Units*

Duplex: Variante de la técnica *PCR* donde se amplifican simultáneamente dos secuencias del template.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, acrónimo inglés para *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

GC: Parámetro referente al contenido porcentual de pares guanina y citosina en el genoma.

GLY: Clave para amplicón del gen Glicina sintasa.

Hits: Puntaje de secuencias comunes encontradas por un algoritmo heurístico en la base de datos, con base en la secuencia de interés.

HYPO: Clave para amplicón de un gen pronosticado como proteína hipotética.

***In silico*:** Elaborado vía computacional.

KMP: Clave para amplicón del gen relacionado a la proteína de membrana cinetoplastida.

MLEE: Electroforesis de enzimas multilocus, acrónimo inglés para *MultiLocus Enzyme Electrophoresis*.

MM: Marcadores moleculares.

Multiplex: Técnica de *PCR* que amplifica simultáneamente diferentes secuencias del template.

NTDs: Grupo de las enfermedades tropicales desatendidas, acrónimo en inglés para *Neglected Tropical Diseases*.

P5CR: Clave para amplicón del gen asociado a Pirrolina-5-carboxilato reductasa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas inglés *Polymerase Chain Reaction*.

PM: Peso molecular.

Polixeno: Parásito que precisa durante su ciclo vital de diferentes hospederos.

RAPDS: acrónimo en inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido, acrónimo inglés para *Single Nucleotide Polymorphism*.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

Tc: *Trypanosoma cruzi*.

Thio: Clave para amplicón del gen relacionado al putativo de tiorredoxina.

Tm: Temperatura de fusión durante anillamiento, acrónimo en inglés para *Melting Temperature*.

Valor E: Describe el ruido de fondo aleatorio durante la búsqueda de alineamientos, ocasionado por el similar tamaño entre secuencias distintas a la de interés.

ÍNDICE

Página de aprobación	ii
Resumen en español	vi
Resumen en inglés	vii
Dedicatoria	viii
Agradecimientos	ix
Glosario	x
Introducción	1
<i>La enfermedad de Chagas</i>	1
<i>Fase aguda</i>	1
<i>Fase sub-aguda o indeterminada crónica asintomática</i>	2
<i>Fase crónica</i>	2
<i>El parásito Trypanosoma cruzi</i>	4
<i>Vías de transmisión</i>	5
<i>Correlación de los linajes con patología y geografía</i>	5
<i>Diferenciación de linajes</i>	5
Justificación	8
Objetivos	9
<i>Objetivo general</i>	9
<i>Objetivos específicos</i>	9
Materiales y Método	10
<i>Selección in silico de genes candidatos para marcadores</i>	10
<i>Diseño de marcadores moleculares</i>	11
<i>Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares</i>	11
<i>Especificidad de los marcadores diseñados</i>	12
<i>Optimización con PCR Multiplex</i>	13

<i>Selección in silico de enzimas de restricción</i>	15
<i>Diferenciación por digestión enzimática</i>	15
<i>Amplicones de distintas longitudes</i>	16
Resultados	17
<i>Selección in silico de genes candidatos para marcadores</i>	17
<i>Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares</i>	18
<i>Especificidad de los marcadores diseñados</i>	19
<i>Optimización con PCR Plex</i>	23
<i>Selección in silico de enzimas de restricción</i>	24
<i>Diferenciación por digestión enzimática</i>	25
<i>Amplicones de distintas longitudes</i>	26
Discusión	28
<i>Selección in silico de candidatos para marcadores</i>	28
<i>Caracterización de marcadores moleculares</i>	28
<i>Especificidad de los marcadores diseñados</i>	29
<i>Optimización con PCR Multiplex</i>	30
<i>Diferenciación por digestión enzimática</i>	30
<i>Amplicones de distintas longitudes</i>	31
Conclusiones	33
Perspectivas	34
Anexos	35
Literatura citada	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo epidemiológico completo del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.	Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares	18
3.	Especificidad de los marcadores moleculares	20
4.	Especificidad de los marcadores moleculares	21
5.	Especificidad de los marcadores moleculares	22
6.	Optimización con <i>PCR</i> Multiplex	23
7.	Diferenciación por digestión enzimática	25
8.	Amplicones de distintas longitudes	26
9.	Amplicones de distintas longitudes	27

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
<i>I.</i>	<i>Cantidades de reactivos para las combinaciones de PCR Multiplex</i>	14
<i>II.</i>	<i>Secuencia y características de los marcadores moleculares diseñados</i>	17
<i>III.</i>	<i>Cantidad y calidad de ADN de las muestras analizadas en NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer</i>	19
<i>IV.</i>	<i>Enzimas de restricción seleccionadas</i>	24

Introducción

La enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) es el agente causante de la mortal enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana (Araujo-Jorge, 2010; Brener, 1973; Reyes, 2009; Storino 1994), que constituye un problema global al afectar alrededor de 6 - 8 millones de personas (CDC, 2019; WHO, 2019). La letalidad inesperada en latinoamericanos se estima a más de 12,000 habitantes por año (Schmunis, 2010). En México se estima una prevalencia de aproximadamente 1'100,000 habitantes infectados debido mayormente a factores de condiciones socioculturales (Salazar-Schettino, 2016).

La patogénesis de la afección se caracteriza por desarrollarse una infección generalizada, que desarrolla tres cuadros clínicos: fase aguda, sub-aguda o indeterminada crónica asintomática y cronicidad (CDC, 2017; MinSal, 2010).

Fase aguda

Se caracteriza por un nivel de parasitemia muy elevado, así como por invasión tisular, tras los 14 días de incubación (OPS, s/a). Puede presentarse de cuatro semanas a dos meses, pasando en el 70 % de los casos desapercibida. Esto ocurre generalmente por conllevar síntomas leves y/o semejantes a los de enfermedades febriles, lo que evita el examen médico del enfermo. Sin embargo, otras complicaciones pueden ser miocarditis aguda o meningoencefalitis (CDC, 2017; OPS, s/a).

Durante el cuadro clínico, en algunos de los casos se presenta un nódulo subcutáneo con adenitis, denominado como 'chagoma' o 'signo de Romaña', el cual se forma en el sitio donde ocurrió la picadura, no necesariamente la inoculación del protozooario. Esta inflamación se forma por la saliva del redúvido que puede estar libre de parásitos; sin embargo, se le vincula como un rasgo característico de la enfermedad, a pesar de ser reconocido en tan solo el 1.5 % de los individuos afectados, siendo niños y adultos la mayoría (Carabarin, 2013; CDC, 2017).

Cabe mencionar que únicamente durante esta fase, la infección puede ser completamente combatida con los fármacos actualmente existentes (Barrett, 2003; Brener, 2000; Dumontiel, 1999).

Fase sub-aguda o indeterminada crónica asintomática

Tiende a ser más longeva, pero con duración variable de cinco a 40 años (Dumontiel, 1999). Esta fase es generalmente inadvertida por ser totalmente asintomática y por decrecer a un nivel casi indetectable la cantidad de parásitos en el torrente sanguíneo, lo que dificulta su detección serológica y exámenes clínicos (electrocardiográficos y radiológicos) (Dumontiel, 1999; Storino, 1994). No obstante, existen reportes de anomalías anatómicas y funcionales, así como también de muertes repentinas (Barrett, 2003).

Fase crónica

Por otro lado, la fase crónica es la más severa, con complicaciones desarrolladas por un 20 - 40 % de los pacientes (CDC, 2017; Dumontiel, 1994; Rassi, 2010). En esta fase la forma infecciosa del protozooario se multiplica repetitivamente de modo intracelular por divisiones binarias, para después liberarse al torrente sanguíneo y continuar por diseminación de la infección a células adyacentes por fagocitosis (Kowalska, 2011). Esto puede ocasionar daños viscerales irreversible, como ‘mega síndromes digestivos’ al afectar por crecimiento desproporcional tisular el intestino, colon y/o esófago de 10 – 15 % de los infectados (Apt, 2010; Arriagada, 2014). Además, otra afectación conocida como ‘miocardiopatía chagásica’, desarrollada en 30 – 50 % de personas en fase crónica, lo que genera arritmias, dolor torácico, embolias pulmonares, disnea, edemas, insuficiencias cardiacas, entre otras manifestaciones clínicas (Apt, 2011). Generalmente tras presentar lesiones cardiacas, el paciente fallece dentro de los próximos cinco años (Hontebeyrie, 2010).

El ineficaz tratamiento para todas las fases de la enfermedad, recae en dos principales componentes nitroheterocíclicos: Nifurtimox y Benznidazol (Alina, 2013). El primero introducido en 1960 por Bayer y el segundo en 1974 por Roche. Ambos con muy baja eficacia de curación durante las fases sub-aguda o indeterminada crónica asintomática y crónica (entre 70 % y < 50 %)

y con comunes efectos colaterales de alto riesgo, pero con éxito casi total durante la primera fase (Alina, 2013; Barrett, 2003; Werner, 2010).

La falta de fármacos eficaces en cada cuadro clínico, técnicas de diagnóstico y vacunas ineficientes se vincula con lo anterior, así como con la heterogeneidad de la población parasita (Arriagada, 2014). Lo cual no solo complica el diagnóstico clínico, sino también su terapia y profilaxis, lo que por ende aumenta la tasa de mortalidad. Aunado a ello viene la complejidad del diagnóstico, puesto que recae en la fase en la que se encuentre el parásito (Apt, 2006; Zingales, 2012). Si se trata de la fase aguda, ya que el nivel de parasitemia es elevado, los análisis microscópicos de sangre o de fluido espinal-cerebral bastarán, mientras que, si se encuentra en la segunda o tercera fase, donde *T. cruzi* ya no se alberga en el torrente sanguíneo en altas cantidades, se recomiendan serologías por *ELISA* o *PCR* de fluido sanguíneo o tejido miocárdico (CDC, 2017), pero con muy baja probabilidad de detección.

Otros obstáculos contra los fármacos Nifurtimox y Benznidazol son la baja disponibilidad a pesar de la donación desde 2007 de Nifurtimox por Bayer. Esto debido a que no se encuentran incluidos en el cuadro básico de medicamentos esenciales de México. Sin embargo, las normas mexicanas indican el uso de Benznidazol de segunda línea y Nifurtimox de primera línea, aunque la Secretaría de Salud no cuenta con un fondo destinado para la compra de fármacos necesarios para tratar la enfermedad; resulta evidente que el ayudar a pacientes mexicanos con tripanosomiasis americana, no es parte de las prioridades del gobierno (Mane, 2013; WHO, 2018). Igualmente son difíciles de conseguir autónomamente, porque los tratamientos carecen de licencia comercial, por lo que cada importación precisa de un permiso especial, lo que conlleva a largos periodos de espera. Todo esto, aunado al impedimento económico. Existe un pobre interés de las compañías productivas a causa de la ganancia mínima, al tratarse mayormente de pacientes de escasos recursos, es un gran inconveniente para su producción y distribución global. A la enfermedad se le cataloga a nivel global dentro del grupo de las enfermedades tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases; NTDs*) y como la cuarta enfermedad de importancia en *Años de vida ajustados por discapacidad (AVAD)* en América (Apt, 2006; Barrett, 2003; Mane, 2013; WHO, 2018).

El parásito *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado de 15 – 24 µm de largo, con forma de vida parasitaria heteroxena, es decir con dos hospederos distintos; siendo uno el vector triatomino, y otro un reservorio mamífero (Lee, 2010). Donde su morfogénesis depende según el ambiente en el que se encuentre, es decir, con base en la etapa de su ciclo epidemiológico (Figura 1). Este parásito pertenece al reino Protista, filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero Schizotrypanum y especie *cruzi* (de Lana, 2010; Lee, 2000) Se distingue por el cinetoplasto o kinetoplasto, organelo especializado de carácter extranuclear (de Lana, 2010). Actualmente se le agrupa en siete linajes, de incluirse el genoma de *T. cruzi marinkellei*: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat con base en inferencias filogenéticas y marcadores moleculares nucleares y mitocondriales (Arriagada, 2014; Brisse, 2000; Flores, 2011).

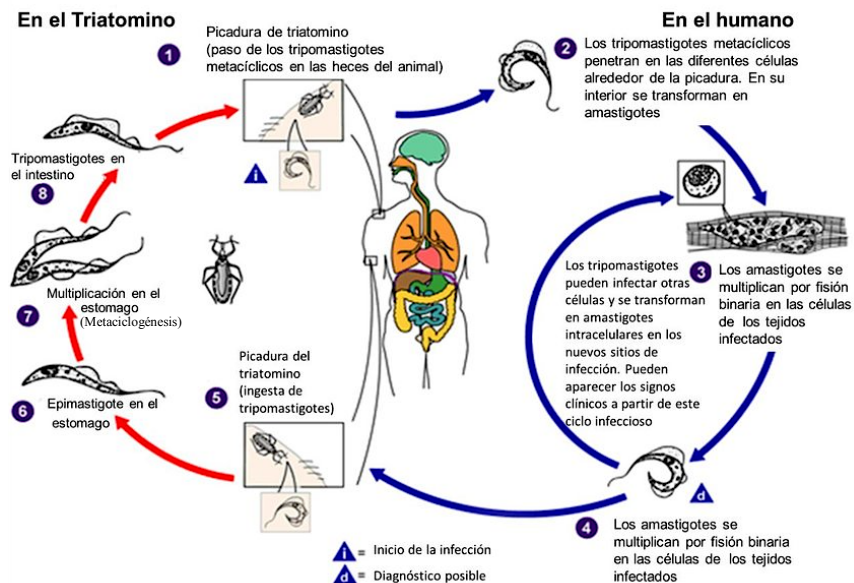


Figura 1. Ciclo epidemiológico completo del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Estadios evolutivos. Tripomastigote: Elongado, ondulante largo, no proliferativo pero infectivo; intestino y recto del insecto y torrente sanguíneo del huésped (1, 2, 3, 5 y 8). Amastigote: Esférico sin flagelo, replicativo; citoplasma del hospedero (3 y 4). Epimastigote: Elongado ondulante corto, replicativo pero no infectivo; intestino del vector (6 y 7)

(Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention website, 2015)

Vías de transmisión

El contagio es posible por otras vías además de la vectorial. Estas pueden ser a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, transmisión vertical congénita o transplacentaria, accidentes de laboratorio e ingesta de alimentos o bebidas infectadas (WHO, 2015). Ello aunado a migraciones y a los vastos reservorios silvestres y domésticos del parásito, clasificados dentro de ocho ordenes como organismos voladores, terrestres y arborícolas, han consolidado la globalización de la patología (Arriagada, 2014; WHO, 2015).

Correlación de los linajes con patología y geografía

Por las particularidades (asexualidad, diploidia, organización genómica, recombinación génica por comportamiento clonal, variaciones en el número de copias cromosómicas y adaptación a los hospederos) de *T. cruzi*, se cree que el tropismo tisular de la infección y diversidad de virulencia, se relacionan directamente con cada uno de los linajes descritos (Guhl, 2013; Zingales, 2012). Es decir que cada linaje desencadena una distinta patología (Dorn, 2017; Gómez, 2008; Reis-Cunha, 2018). Lo que nos lleva a especificar y explicar que al *DTU I* (unidades discretas de tipificación) se le vincula a cardiopatías y casos agudos, una distribución silvestre y antrópica en América. Mientras que los *DTU II*, *V* y *VI* están en ambientes domésticos del cono sur, con encuentros esporádicos en el norte, ocasionando manifestaciones cardíacas, megaesófago y megacolon. Y las dos variantes restantes *DTU III* y *VI* carecen de relación a infecciones crónicas, ambas con distribución enzoótica (Ceballos, 2010; Guhl, 2013; Arriagada, 2014; Zingales, 2012).

Diferenciación de linajes

Inicialmente los vectores dispersores de la enfermedad eran únicamente los marsupiales, pero por motivos de adaptación y coevolución *T. cruzi* amplió su gama de organismos mamíferos reservorios, en quienes consigue completar su ciclo de vida polixeno (Jansen, 2010). Aquello, su generalización, puede ser un factor que potenció la formación de varios linajes; puesto que hace más de 10 millones de años, cuando se restringía a marsupiales, se trataba de un solo linaje, es decir, que aún no ocurría la primera divergencia evolutiva de este microorganismo (Jansen, 2010). Por otro lado, se desconoce si dicho crecimiento influyó en la presencia de variaciones

cromosómicas numéricas en su genoma; lo cual varía de acuerdo a cada *DTU*, es decir que cada linaje genético puede estar compuesto por distinto número de genes y éstos varían en su tamaño (Guhl, 2013; Reis-Cunha, 2019; Stevens; 1999). Por otra parte, las sustanciales diferencias genéticas se han ido descubriendo a más de 100 años de su descripción, a través de herramientas moleculares, tales como secuenciación, *PCR*, *MLEE*, *RAPDS*, entre otras (Gómez, 2008; Guhl, 2013; El-Sayed, 2005; Reyes, 2009); aunque se evalúa la existencia del parásito desde hace 680 millones de años (Imbert, 2003).

Para la caracterización de microorganismos asexuales, como *T. cruzi* donde es imposible de realizar la diferenciación de linajes por vía morfológica (FAO, 2010), se utilizaban anteriormente otras técnicas moleculares codominantes no tan finas, informativas y/o eficientes, filogenética y económicamente hablando *e.g.* *RAPDS/MLEE*, microsátélites (El-Sayed 2005; Flores 2011). Ahora, por los avances en las técnicas de secuenciación, y mejora de técnicas *per se*, se ha logrado secuenciar y diferenciar genomas de distintos linajes genéticos, incluyéndose los de nuestro interés (TcI, TcII, TcII, TcIV, TcV y TcVI). Lo cual nos permite diseñar nuevos marcadores moleculares con la resolución adecuada para vislumbrar vía *PCR* las discrepancias puntuales entre los varios grupos de parásitos al mapear polimorfismos genéticos, localizar y aislar dichas secciones específicas del *ADN*. Otras parasitosis (*e.g.* toxoplasmosis, malaria, leishmaniasis) están actual y exitosamente utilizando dicha técnica molecular para su diagnóstico, determinación de dosis y/o medicamento (Gill, 2008; Lefebvre, 1995; Lulitanond, 2012; Rentería, 2007; Verweij, 2014; Ward, 2002; Weiss, 1995). La mayor y principal ventaja de nuestro diseño, es que se ha utilizado la mayor información genética disponible para evaluar la diversidad génica dentro de la misma especie (a nivel linaje); actualmente hay cuatro genomas de *T. cruzi* secuenciados y anotados, en donde 2 genomas son del linaje TcI, y otro es TcVI, y TcII. Método ciertamente adecuado por su alto rendimiento, y factibilidad de entrelazar con otras técnicas *e.g.* la inserción de enzimas restrictivas, *PCR* Multiplex, entre otras, como lo son la secuenciación y purificación.

Sobre todo, en el caso de trabajar con muestras de bajo nivel de parasitemia (fase intermedia y/o crónica) y/o silvestres; *ADN* que a diferencia del de cultivo puede estar deteriorado. Es preferible tener varios objetivos a amplificar dentro de la misma prueba, para garantizar el

aprovechamiento de la muestra. Además, eficientizar tiempo y esfuerzo mientras se disminuyen los costos por prueba, sin arriesgar la calidad de los resultados. Aquello se puede lograr al trabajar con una *PCR* Multiplex. De modo que se ajustan las cantidades de los reactivos utilizados anteriormente para *PCR* convencional. Con la intención de mejorar la capacidad de diagnóstico por prueba, mientras se ahorran reactivos y los ácidos nucleicos a analizar.

Para dicho procedimiento, los marcadores moleculares deben encontrarse dentro de los rangos sugeridos en los siguientes aspectos: 1) temperaturas de anillamiento similares; 2) carecer de homología con respecto a los otros pares y consigo mismos; 3) contar con una longitud mayor a 18 pares de bases por aspectos de especificidad de la amplificación; 4) distribución equilibrada en GC (guanina y citocina) y AT (adenina y timina); 5) y porcentaje de GC entre 35 y 60 % (Elnifro, 2000; Lorentz, 2012). Cumpliendo todos los marcadores propuestos con las recomendaciones mencionadas.

Por otro lado, parte atrayente de utilizar los oligonucleótidos como método de identificación, es que se trata de un método molecular no invasivo, y que demuestra con objetividad si hay o no infección, sin la necesidad de presencia de síntomas. Además, al concluir o durante la terapia permiten mantener un monitoreo sobre la condición y fase clínica del afectado, ya que los marcadores genéticos se asocian a la carga del parásito (i.e. es decir a su abundancia) (Ward, 2002). Cabe resaltar que el diagnóstico en mamíferos o bien, en humanos es complicado. Esto debido a que la mayoría del *ADN* del parásito se hospeda intracelularmente en los tejidos una vez ocurrida la fase aguda, de modo que no es fácil encontrarlo con métodos no invasivos (Alves, 2007). Por lo tanto, como alternativa está la realización de análisis por biopsias.

Otras parasitosis (e.g. toxoplasmosis, malaria, leishmaniasis) están actual y exitosamente utilizando dichas herramientas moleculares para su diagnosis y determinación de dosis o medicamento (Lulitanond, 2012; Verweij, 2014; Ward, 2002; Weiss, 1995). De igual modo se incita el chequeo durante la sintomatología de la fase aguda, es decir cuando se presenten síntomas febriles, como medida de precaución y detección temprana.

Justificación

La falta de herramientas moleculares capaces de diferenciar e identificar de manera eficiente y no invasiva entre los linajes descritos del protozooario *Trypanosoma cruzi*, fue lo que impulsó la realización de esta investigación, y sobretodo el poder aportar en la detección a nivel linaje del microorganismo que ocasiona una de las principales enfermedades parasitarias de México. Debido a que existe una posible relación entre el tropismo y la predisposición de la infección que cada linaje conlleva, resulta importante el estudiar y trabajar de forma que, con contribuciones de este tipo, se pueda conocer más sobre como funciona, evoluciona y puede ser atendida esta compleja zoonosis. Para ser capaces de desarrollar tratamientos y estrategias más adecuadas y efectivas que los actuales.

Los marcadores moleculares propuestos facilitarán estudios sobre tasas de infección, participarán en el entendimiento de síntomas de la patología y en la distribución ecológica del parásito al proveer información filogenética a nivel linaje. Por otra parte, facilitan un mayor rendimiento monetario, de tiempo y trabajo al emplearse las combinaciones y protocolos sugeridos.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar marcadores moleculares para diferenciar los linajes genéticos de *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

1. Seleccionar *in silico* loci y enzimas restrictivas que cumplan los criterios determinados.
2. Caracterizar la funcionalidad y confirmar de la efectividad de los marcadores moleculares en la amplificación de muestras de ADN silvestre y de cultivo de *T. cruzi*.
3. Optimizar la eficiencia de los cebadores moleculares vía *PCR* Duplex y Multiplex.
4. Evaluar el poder discriminatorio de los oligonucleótidos diseñados en colaboración con las enzimas de restricción seleccionadas.

Materiales y Método

Selección in silico de genes candidatos para marcadores

El genoma de *T. cruzi* se encuentra sistematizado en plataformas de datos biotecnológicos. Los genes candidatos se seleccionaron tras un tamizaje general de 41,330 genes, o bien, de los genomas proporcionado por la base de datos: TriTrypDB, Kinetoplastid Genomics Resource (Aslett, 2010; El-Sayed, 2005). Se seleccionaron genes que cumplieran tres criterios: 1) ser copia única en el genoma, 2) existir únicamente en *T. cruzi*, para garantizar marcadores específicos a *T. cruzi* y 3) loci con polimorfismo de un solo nucleótido (*SNP*'s) o mutaciones puntuales particulares para cada linaje genético. De los genes candidatos que cumplieron con los tres criterios, se seleccionaron cinco que presentaron la mayor cantidad de polimorfismos.

Criterio 1. Selección de loci con una sola copia dentro del genoma.

Este criterio se estableció para reducir la probabilidad de amplificar genes parálogos.

La recopilación se realizó manualmente, al analizar los resultados de *BLAST* entre linajes específicos del parásito en cuestión. Las secuencias únicas y con un valor de E menor a 0.05 se trabajaron en el siguiente apartado.

Criterio 2. Secuencias exclusivas de *T. cruzi*.

Seguidamente se corroboró la presencia única con un *BLAST* que contemplara todos los organismos secuenciados y disponibles en el banco de genes de *ncbi*. Posteriormente se les contabilizó la cantidad de *hits* (i.e. posibles secuencias homólogas) en cada linaje (siendo cuatro los de importancia para el trabajo: Esmeraldo, CL Brener, Sylvio y Dm28c). Donde las secuencias que contaron con más de cuatro hits o que carecieron de éstos en los linajes Dm28c y/o CL Brener (TcI) fueron descartadas debido a que éstos son los de radican mayormente en el país.

Criterio 3. Polimorfismos intralínajes.

Los loci recopilados se le alinearon como ácidos nucleicos con el algoritmo *muscle* y se contabilizó la cantidad de *SNP*'s en el software *SeaView*, buscando preferentemente polimorfismos en todos

los linajes. Con base en la cantidad de polimorfismos y marcos de regiones fuertemente conservadas, se definieron los sitios para el desarrollo de los marcadores moleculares en las secuencias agrupadas.

Diseño de marcadores moleculares

Los cebadores fueron diseñados para amplificar regiones que incluyeran polimorfismos discriminantes entre linajes, en el sitio www.bioinfo.ut.ee, con base en la secuencia seleccionada del linaje Dm28c: TcI). Los marcadores se sintetizaron en la compañía T4 Oligo (www.t4oligo.com), después de corroborar su especificidad vía *BLAST*.

Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares

Los oligonucleótidos diseñados (*Tabla 1*) fueron amplificados con las siguientes condiciones de *PCR*, utilizando el termociclador *AB Applied Biosystems Veriti 96-Well*. Todos los cebadores fueron amplificados con las siguientes características: 10X *PCR Rxn Buffer*, 50mM *MgCl₂*, 10 mM de cada *dNTP's* (*VWR Life Science Amresco*), 10 mM de cada cebador *forward* y *reverse*, 5 U/ μ L *Taq DNA* polimerasa (*Invitrogen*) y 10 ng/ μ L de *ADN*, ajustando a 15 μ L con agua *DEPC* estéril (*Ambion*) como volumen final. El *ADN* de los linajes de *T. cruzi* fueron proporcionados por el Dr. Carlos Machado, de la Universidad de Maryland (*Anexo II*).

Las condiciones de temperatura fueron: 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min; un gradiente de 57 °C a 62 °C por 46 s; 72 °C por 46 s y una extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, en solución TAE 1x (*GBiosciences*), a 110V por 30 min (*Bio Rad PowerPac Basic*). Se cargaron 5 μ L de cada amplicón y 2 μ L (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 7 μ L el volumen final por pozo. Se utilizó 1 μ L de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain* (400 μ L, 10,000X in DMSO) (*Invitrogen*) y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200*) (*Figura 2*).

Especificidad de los marcadores diseñados

La especificidad de los cebadores fue probada con *ADN* de cinco grupos de organismos diferentes al filo analizado, Sarcomastigophora. Siendo Bovidae (carne de res), Magnoliophyta (manzana), Nematodo (gusano), Chytridiomycetes (hongo quítrido en anfibios) y Arthropoda (escarabajo, garrapata y mosca) los grupos comparados. El *ADN* de los organismos mencionados fue extraído con el kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen*. Mientras que la calidad y cantidad de *ADN* fue evaluado dos vías, por medio del método de cuantificación en *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Tabla III)* y por comprobación en gel de agarosa al 1%, en solución TAE 1x (*GBiosciences*), a 110V por 30 min (*Bio Rad PowerPac Basic*). Se cargaron 5 µL de cada muestra y 2 µL (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 7 µL el volumen final por pozo. Se utilizó 1 uL de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain (400 µL, 10,000X in DMSO) (Invitrogen)* y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200 (Figura 3)*).

Los marcadores también fueron probados utilizando *ADN* de *Dipetalogaster maxima* infectado por *T. cruzi*, así como también de triatominos no parasitados. Incluyendo siempre los controles negativo y positivo (*ADN* de cultivo: Ev.13.C, DTU I). El *ADN* silvestre, es decir, el que fue extraído de tractos digestivos de reduvidos (*Dipetalogaster maxima*), con los mismos reactivos y protocolo del kit *Invitrogen*, fueron previamente colectados en Baja California Sur, por el Dr. Carlos A. Flores y disectados en condiciones de esterilidad dentro del laboratorio de la Facultad de Ciencias, UABC.

Para comprobar experimentalmente que los marcadores diseñados son específicos para *T. cruzi*, se hizo una *PCR* igualando las cantidades antes mencionadas, pero variando las muestras de *ADN*. Se trabajó con *ADN* de los grupos para control cladístico comentados, *ADN* silvestre de *D. maxima* infectado por *T. cruzi*, así como también de triatominos no parasitados. Incluyéndose controles negativo y positivo. Se cargaron 5 µL de cada reacción y 2 µL (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 7 µL el volumen final por pozo. Se utilizó 1 µL de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain (400 uL, 10,000X in DMSO) (Invitrogen)* y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200 (Figura 4)*).

Seguidamente, se realizó una electroforesis visualizada en el fotodocumentador (*Azure c200*), donde se compara la efectividad de los cebadores propuestos en *ADN* de cultivo y *ADN* silvestre (*Figura 5*).

Optimización con PCR Multiplex

Para cada *PCR Duplex* se adicionó 1.5 μL de *ADN* 5ng/ μL y para el multiplex con 2 μL , ambas a 5 ng/ μL de concentración. Las condiciones de temperatura para la *PCR* fueron las siguientes, 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s; 57°C (*Tabla I, A*), 59°C (*Tabla I, B y C*) y 61°C (*Tabla I, D*) por 50 s; 72°C por 50 s y una extensión final de 5 min a 72°C. Se cargaron 5 μL de cada reacción y 2 μL (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 7 μL el volumen final por pozo. Se utilizó 1 μL de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel de agarosa al 2.2 % fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain* (400 uL, 10,000X in DMSO) (*Invitrogen*), corrido a 110V por 40 min (*Bio Rad PowerPac Basic*) y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200*) (*Figura 6*).

Tabla I. Cantidades de reactivos para las combinaciones de PCR Multiplex

A	Reactivo	Cantidad (μL)
	KAPA Taq Buffer + Mg	7.8
	dNTP	4.37
	Taq	0.575
	CBS	10
	AMT	4
	DA 1	6
	AAP	3.4
	H ₂ O DEPC	23.98
	ADN	2

B	Reactivo	Cantidad (μL)
	KAPA Taq Buffer + Mg	5.25
	dNTP	1.51
	Taq	0.21
	DA 1	2.3
	KMP	2.3
	H ₂ O DEPC	38.43
	ADN	1

C	Reactivo	Cantidad (μL)
	KAPA Taq Buffer + Mg	5.25
	dNTP	1.51
	Taq	0.21
	KMP	2.6
	DA 2	2.3
	H ₂ O DEPC	38.13
	ADN	1

D	Reactivo	Cantidad (μL)
	KAPA Taq Buffer + Mg	5.25
	dNTP	1.51
	Taq	0.21
	AAP	2.45
	DA 2	2.45
	H ₂ O DEPC	38.13
	ADN	1

E	Reactivo	Cantidad (μL)
	KAPA Taq Buffer + Mg	5.3
	dNTP	1.55
	Taq	0.23
	DA 1	3.1
	KMP	3.1
	DA 2	1.68
	CGL 2	1.9
	H ₂ O DEPC	33.14
	ADN	2

Selección in silico de enzimas de restricción

La búsqueda y selección de enzimas restrictivas (*Tabla IV*) se llevó a cabo en el software *Serial Cloner 2.6.1*, donde se analizaron los loci amplificados por los marcadores diseñados. Donde la prioridad fue sobre los nucleótidos polimórficos de cada linaje, de modo que la enzima que identifique los *SNP's* corte dicha zona distintiva. Dando como resultado un patrón único de digestión por linaje durante la visualización vía electroforesis. Las enzimas de restricción, disoluciones amortiguadoras y cargadores con colorante fueron proporcionadas por *NEBLab*.

Diferenciación por digestión enzimática

Las siguientes *PCRs* se realizaron a un volumen final de 25 μL , cumpliendo con las siguientes características: 10X *PCR Rxn Buffer*, 50mM MgCl_2 , 10 mM de cada dNTP's (*VWR Life Science Amresco*), 10 mM de cada oligonucleótido *forward* y *reverse*, 5 U/ μL Taq DNA polimerasa (*Invitrogen*) y 10 ng/ μL de ADN, ajustando a con agua DEPC estéril (*Ambion*). Las condiciones para el termociclador fueron las mismas descritas anteriormente en '*Optimización de condiciones de amplificación de cebadores*', excepto por la temperatura de anillamiento, la cual se menciona en la *Tabla II*. Se cargaron 5 μL de cada reacción y 2 L (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 7 μL el volumen final por pozo. Se utilizó 1 μL de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel de agarosa al 1 % fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain* (400 uL, 10,000X in DMSO) (*Invitrogen*), corrido a 110V por 30 min (*Bio Rad PowerPac Basic*) y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200*) (*Figura 6*).

Una vez confirmado el éxito del *PCR*, a cada muestra se le realizó una digestión enzimática, con las enzimas de restricción y *buffer* correspondientes. La mezcla por muestra fue de 30 μL volumen final, compuesta por agua DEPC estéril, producto de *PCR*, *Buffer Rapid DNA Dephos & Ligation Kit* recomendado (*Roche*), 1 μL por 20,000 U/mL de enzima de restricción (*NEBLab*). Se homogenizó con la técnica *up & down* y dejó en incubación durante una hora, 37°C con agitación constante de 50 rpm. La evaluación de cada producto tras la digestión enzimática, se llevó a cabo vía electroforesis al cargar 10 μL de cada reacción y 2 μL (10x, 1 % SDS) de buffer cargador, siendo 12 μL el volumen final por pozo. Se utilizó 1 μL de escalera de 100 bp (*Biotechnology*). El gel de agarosa al 3 % fue teñido con *SyberSafe DNA Gel Stain* (400 uL, 10,000X in DMSO)

(Invitrogen), corrido a 110V por 50 min (*Bio Rad PowerPac Basic*) y visualizado en el fotodocumentador (*Azure c200*) (*Figura 7*).

Amplicones de distintas longitudes

Se buscaron por medio de un *BLAST* entre los linajes de Tc I (Dm28c, JRcl4 y Sylvio), Tc II (Esm) y Tc VI (Tulacl2 y Non_Esm), genes con presencia única en cada genoma y que fueran de distintas longitudes entre ellos. Para obtener amplicones de diferentes tamaños y poder así, identificar a cada linaje con base en su número de pares de bases, vía *PCR* y electroforesis. Se incluyeron en el alineamiento a los linajes: Dm28c, Sylvio, Esm, CL Brener, Non_Esm y *T. cruzi marinkellei*. Secuencias obtenidas del servidor *TriTrypDB*. Se hizo un *BLAST* de los amplicones en *ncbi* para corroborar que se amplificaran segmentos únicos del microorganismo de interés.

Tras la intensiva búsqueda y análisis se denominó a Hypothetical protein, clave HYPO, que amplifica 337 bp en *DTU I*, 397 bp en *DTU II* y 383 bp en *DTU VI* con las condiciones para *PCR*: 95°C por 3 min; 35 ciclos por 1 min, 59°C por 40 s y a 72°C por el mismo tiempo, con una extensión final de 10 min a la misma temperatura. Se revisó el producto vía una electroforesis clásica (*Bio Rad PowerPac Basic*) en gel de agarosa al 3 % por 110V, 30 min y electroforesis *FIGE 3 %* (*Bio Rad PowerPac Basic*) por 110V, 20 min, se invierten los polos por 15 minutos y nuevamente se gira el gel por 20 minutos más.

Resultados

Selección in silico de genes candidatos para marcadores

Adelante se presentan los diez genes que cumplieron con los tres criterios de selección, junto con los 12 oligonucleótidos moleculares que se diseñaron sobre ellos, más características relevantes al estudio.

Tabla II. Secuencia y características de los marcadores moleculares diseñados.

Nombre del gen, secuencias, tamaños esperados en nucleótidos de los amplicones, temperatura idónea en grados centígrados y cantidad de polimorfismos presentes.

Gen	Secuencias (5' – 3')	Tamaño amplicón (bp)	Tm (°C)	SNPs
Amino acid permease-like protein	AAP-F: TCTCTCTGGGACCATTACAG AAP-R: CGCCGTGAGACATGTAACAG	350	58	15
Ammonium transporter	AMT-F: TGCAGGTTTGGCTGGTATTAC AMT-R: TCTCCAATAAACAGGCTGCTG	510	61	12
Cystathionine beta synthase	CBS-F: GAAGCCTGTGGGCAATTTTA CBS-R: GCGGAGCAGTTTGAAGTAGC	591	59	10
Cystathionine gamma lyase	CGL-F1: GAAGCATTGGTTTCCGACT CGL-R1: TGATCACCCGCACTCATAAA	333	61	8
Cystathionine gamma lyase	CGL-F2: ATCACCGATTGCAGTTACGG CGL-R2: CGTCTCCGAAAGAACCAACT	150	60	4
Diacylglycerol acyltransferase	DA-F1: TTGACAGTAGCACGCAGAGG DA-R1: ACAGCACCTCGAGGGATTTA	436	58	12
Diacylglycerol acyltransferase	DA-F2: CCCAACCGTGCCGTA DA-R2: GGCCTTTGCGCGTA	190	60	6
Glycine synthase	GLY-F: CGTTCTGCACAGTCTTACC GLY-R: CCCCATTGATAACAGCAA	331	59	6
Hypothetical protein	HYPO-F: GCGTACACAGGTAGCGAGTG HYPO-R: AACCCACCAAAGAGGTGACA	337*, 397**, 383***	59	5
Kinetoplastid membrane protein	KMP-F1: ATGGCCACCACTCTTGAGG KMP-R1: ACTCAGCAAATTTGGCCTTG	238	61	6
Pyroline 5 carboxylate reductase	P5CR-F: ATGCCGTTTGTTCAGTGGTC P5CR-R: GCGTTTGGTGTGACAGAAGT	190	61	5
Thioredoxin putative	Thio-F1: TTTTTCGGAGGCCTTC Thio-R1: CGTGGCTTGAAGAGAAGA	464	58	8

Nota: Tamaño de amplicones para * DTU I, ** DTU II y *** DTU VI.

Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares

Se pruban los 12 cebadores sintetizados en siete cepas distintas, para conocer y comparar su eficacia.

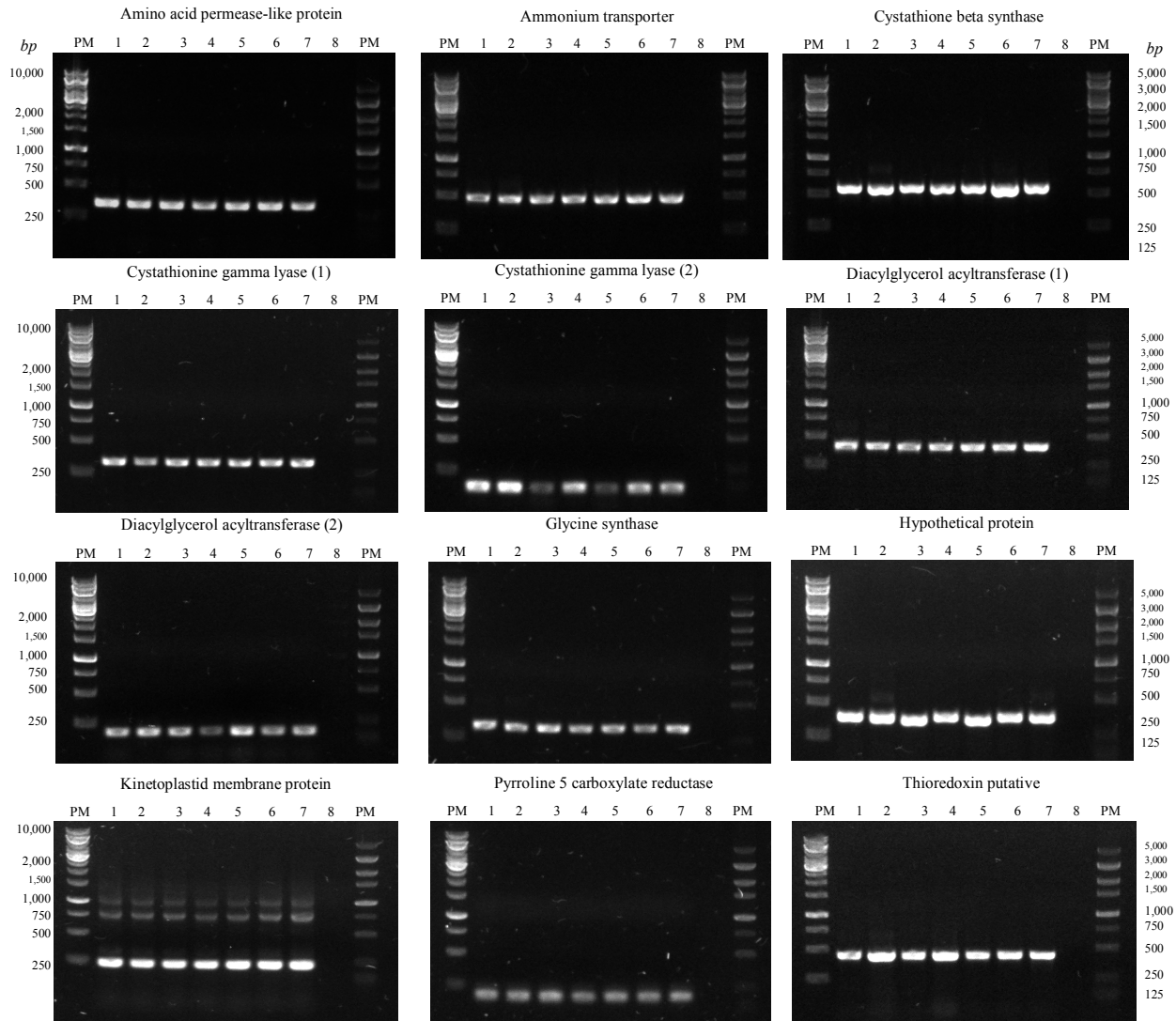


Figura 2. Optimización de condiciones para amplificación de marcadores moleculares.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Sybersafe; 110V, 30 min. Prueba a cada marcador molecular en siete diferentes cepas de ADN de *T. cruzi*, dónde se evidencia la efectividad de los cebadores. PM: Peso molecular conocido, izq: 11 fragmentos de 250 – 10,000 y der: 9 fragmentos de 125 – 5,000 pares de bases (bp). 1: Tulac12, 2: PSC-O, 3: EV13c, 4: CAN III, 5: CA-1-05, 6: CBB cl3, 7: EsmclZ2 y 8) Control (-).

Especificidad de los marcadores diseñados

Adelante se evidencian los resultados cuantitativos correspondientes a la calidad del ADN y cantidad por absorbancia 260/280 de los diferentes grupos taxonómicos procesados para este apartado experimental.

Tabla III. Cantidad y calidad de ADN de las muestras analizadas en NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

Muestras	260/280	Cantidad ADN (ng/μL)
Bovidae – 1	1.67	46.6
Bovidae – 2	1.82	26.9
Bovidae – 3	1.91	86.7
Magnoliophyta – 1	1.92	37.5
Magnoliophyta – 2	2.95	5
Magnoliophyta – 3	1.19	17.4
Nematodo – 1	1.44	7.1
Nematodo – 2	1.72	22.5
Chytridiomycetes – Bd	1.77	21.1
Arthropoda – Coleoptera – 1	1.29	51.4
Arthropoda – Coleoptera – 2	1.4	109.6
Arthropoda – Coleoptera – 3	1.44	114.5
Arthropoda – Ixodida – 1	1.71	75.6
Arthropoda – Ixodida – 2	1.72	187.3
Arthropoda – Ixodida – 3	1.65	119.1
Arthropoda – Diptera – 1	1.74	3.5
Arthropoda – Diptera – 2	1.78	49.7
Arthropoda – Diptera – 3	1.78	52.9

Además, se valoró la integridad del *ADN* previamente cuantificado, para corroborar la calidad vía electroforesis en gel.

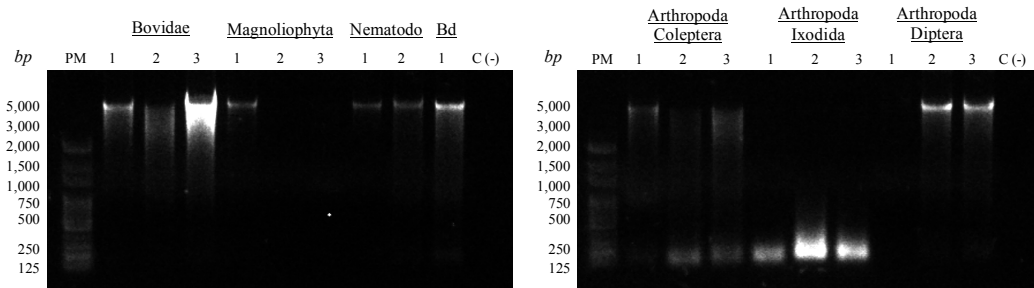


Figura 3. Especificidad de los marcadores diseñados

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Sybersafe; 110V, 30 min. A muestras de *ADN* extraído de los diferentes grupos externos de organismos, dónde se evidencia la calidad del mismo. PM: Peso molecular conocido, 13 fragmentos de 100 – 3,000 pares de bases (bp). C (-): Control negativo.

Tras analizar por cuantificación la cantidad y calidad de las muestras con ayuda del NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer y visualizar en un gel de agarosa los amplicones, se procedió a elegir las muestras idóneas para el siguiente paso. Siendo éstas las de mejor calidad. Con base en los resultados sobre la cuantificación de la cantidad y calidad de las muestras, se eligieron los productos de *ADN* pertenecientes a los grupos externos: Bovidae – 1, Magnoliophyta – 1, Nematodo – 2, Bd, Arthropoda – Coleoptera – 1 y Arthropoda – Diptera – 2, con el fin de verificar la especificidad de los MM diseñados vía PCR.

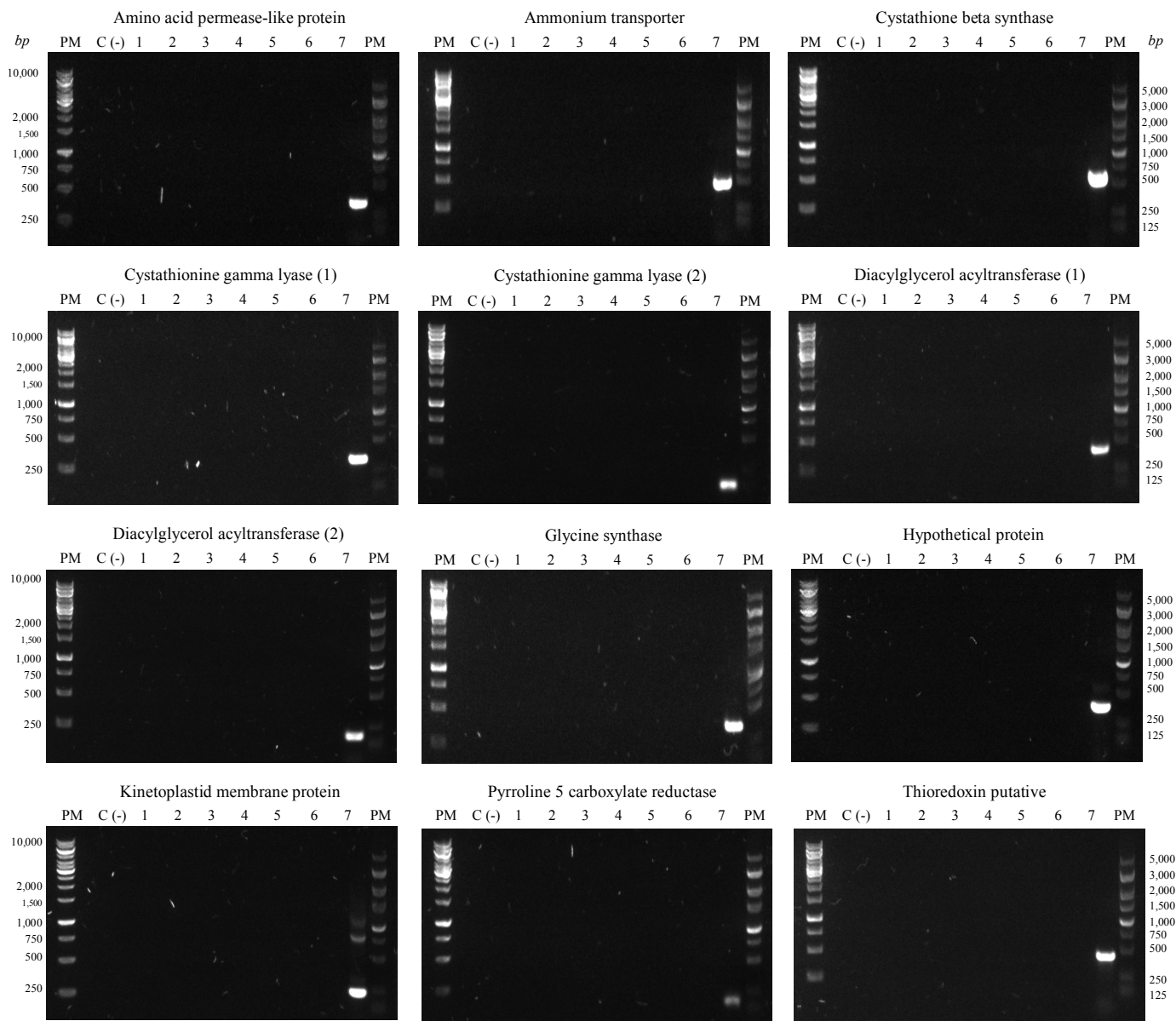


Figura 4. Especificidad de los marcadores diseñados

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Sybersafe; 110V, 30 min. A muestras de ADN extraído de los diferentes grupos externos de organismos, dónde se evidencia la especificidad de cada oligonucleótido hacia *T. cruzi*. PM: Peso molecular conocido, izq: 11 fragmentos de 250 – 10,000 y der: 9 fragmentos de 125 – 5,000 pares de bases (bp). 1: Bovidae – 1, 2: Magnoliophyta – 1, 3: Nematodo – 2, 4: Bd, 5: Arthropoda – Coleoptera – 1, 6) Arthropoda – Diptera – 2C, 7) ADN cultivo cepa CBBcl3 y C (-): Control negativo.

Como estudio comparativo se cargaron contiguamente dos muestras que amplifican al mismo locus, pero una con *ADN* de cultivo mientras que la otra con *ADN* silvestre. Facilitándose de este modo la visualización de la efectividad de los cebadores diseñados en muestras genómicas de distinta procedencia.

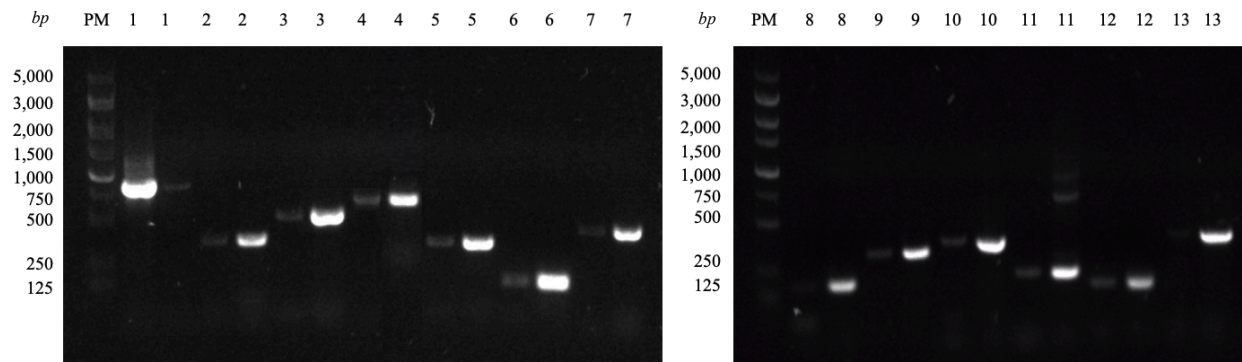


Figura 5. Especificidad de los marcadores diseñados

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Sybersafe; 110V, 30 min. Comparativa de efectividad en cada marcador entre muestras de *ADN* extraído de chinches (*D. maxima*) infectadas por *T. cruzi* (banda derecha), y su respectivo control con la cepa cultivada *CBBcl3* (banda izquierda); orden invertido en primero dos carriles por ser el control. PM: Peso molecular conocido, 9 fragmentos de 125 – 5,000 pares de bases (bp). 1: *TcSC5D*, 2: *Amino acid permease-like protein* 3: *Ammonium transporter*, 4: *Cystathione beta synthase*, 5: *Cystathionine gamma lyase* (1), 6: *Cystathionine gamma lyase* (2), 7: *Diacylglycerol acyltransferase* (1), 8: *Diacylglycerol acyltransferase* (2), 9: *Glycine synthase*, 10: *Hypothetical protein*, 11: *Kinetoplastid membrane protein*, 12: *Pyrroline 5 carboxylate reductase* y 13: *Thioredoxin putative*.

Optimización con PCR Plex

Se obtuvieron cinco combinaciones distintas con los oligonucleótidos propuestos, componiéndose una de las mezclas (1) por los marcadores que con ayuda de las enzimas restrictivas discriminan entre linajes. El resto de las composiciones fueron basadas únicamente en los tamaños de los amplicones esperados, procurando evitar traslapes.

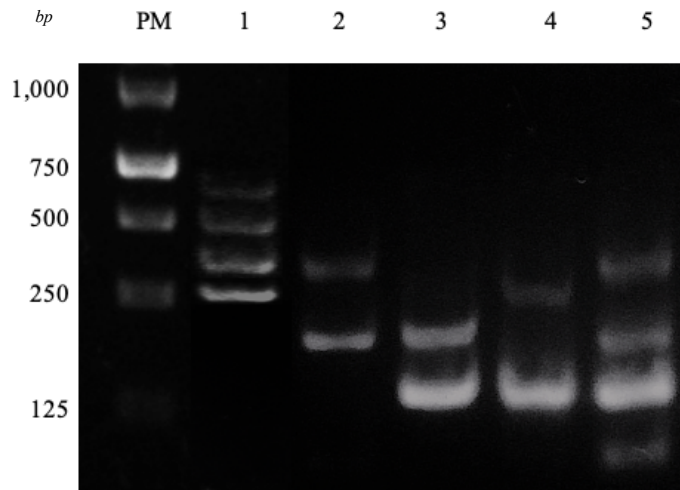


Figura 6. Optimización con PCR Multiplex.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.2 %, teñido con Sybersafe; 110V, 35 min. Diferentes combinaciones de plex utilizando el ADN de cultivo, cepa CA-1-05. PM: Peso molecular conocido, 5 fragmentos de 125 – 1,000 pares de bases (bp). De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: 1) Cystathione beta synthase, Ammonium transporter, Diacylglycerol acyltransferase (1) y Amino acid permease-like protein 2) Diacylglycerol acyltransferase (1) y Kinetoplastid membrane protein 3) Kinetoplastid membrane protein y Diacylglycerol acyltransferase (2) 4) Amino acid permease-like protein y Diacylglycerol acyltransferase (2) 5) Diacylglycerol acyltransferase (1), Kinetoplastid membrane protein, Diacylglycerol acyltransferase (2) y Cystathionine gamma lyase.

Selección in silico de enzimas de restricción

Adelante se presentan las ocho enzimas capaces de distinguir entre los linajes del parásito en cuestión, junto con características de importancia a la investigación.

Tabla IV. *Enzimas de restricción seleccionadas.*

Enzima de restricción, linaje identificado por corte enzimático (LIPCE) y secuencias, disolución amortiguadora óptima para escisión, posición en nucleótidos de corte en el amplicón y tamaños de fragmentos en nucleótidos tras digestión. En la segunda columna se mencionan primero los linajes que se distinguen o discriminan con ayuda de las enzimas de restricción, tras el guión se refiere a los que pueden inferirse.

GEN		<i>Cystathionine beta synthase</i>				
Enzima	Identifica	Secuencia 5' a 3'	Secuencia 3' a 5'	Amortiguador	Posición	Tamaño amplicón (nt)
BseYI	I	CCCAGC	GGGTCG		3	478 477 y 108
AvaII	I, II y VI	GGWCC	CCWGG		4	373 372 y 219

GEN		<i>Diacylglycerol acyltransferase</i>				
Enzima	Identifica	Secuencia 5' a 3'	Secuencia 3' a 5'	Amortiguador	Posición	Tamaño amplicón (nt)
AluI	II y VI	AGCT	TCGA		4	314 314 y 122
Sau96I	II	GGNCC	CCNGG		4	336 336 y 100
SalI	I and VI	GTCGAC	CAGCTG		3	338 337 y 93

GEN		<i>Amino acid permease-like protein</i>				
Enzima	Identifica	Secuencia 5' a 3'	Secuencia 3' a 5'	Amortiguador	Posición	Tamaño amplicón (nt)
AccI	I y II - VI	GTMKAC	CAKMTG		4	289 289 y 61
BstZ17I	I y II - VI	GTATAC	CATATG		4	289 289 y 61
FauI	II	CCCGC	GGGCG		4	293 293 y 57

Diferenciación por digestión enzimática

Se cargaron los productos amplificados vía PCR de los tres cebadores con suficiencia para la discriminación de linajes de dos modos, sin pasar por el proceso de digestión como control negativo y tras ser cortados por digestión enzimática.

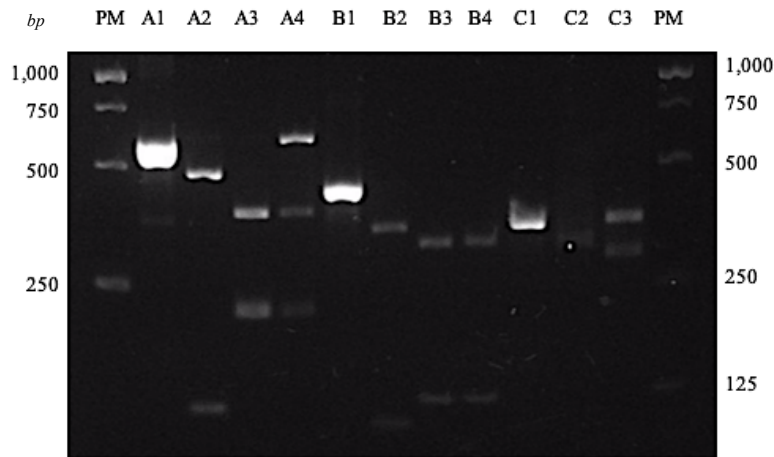


Figura 7. *Diferenciación por digestión enzimática.*

Electroforesis en gel de agarosa al 3 %, teñido con Sybersafe; 110V, 50 min. Comparación de cada marcador entre muestras de ADN extraído de chinches (D. maxima) infectadas por T. cruzi (banda derecha), y su respectivo control con la cepa cultivada CBBcl3 (banda izquierda). PM: Peso molecular conocido, 5 fragmentos de 125 – 1,000 pares de bases (bp). Correspondiendo A1, B1 y C1 a los controles de Cystathione beta synthase, Amino acid permease-like protein y Diacylglycerol acyltransferase (1), respectivamente. Las letras semejantes con numeración distinta son bandas fragmentadas tras el corte enzimático.

Amplicones de distintas longitudes

Como método alternativo se probó amplificar dos locus de distinto tamaño en cada linaje y separar los fragmentos con dos técnicas.

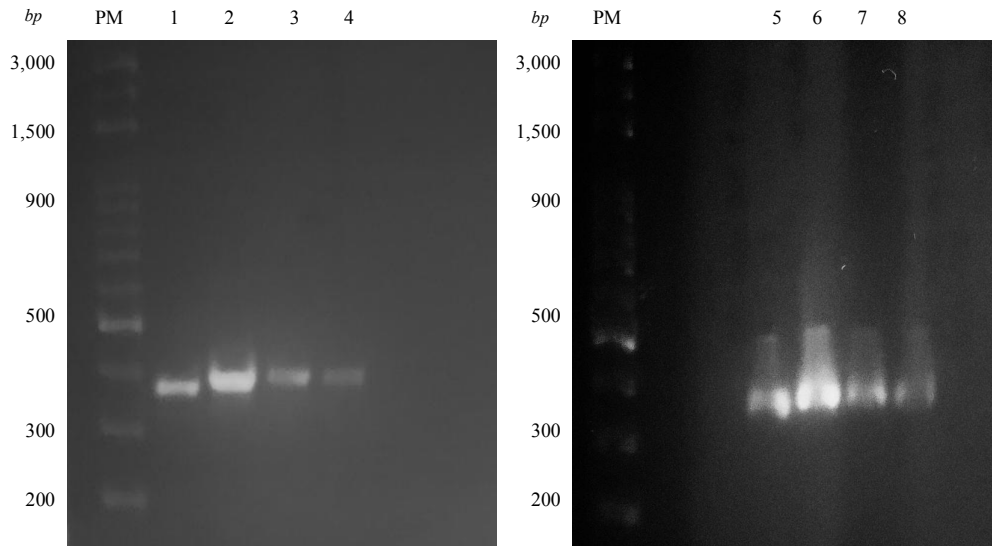


Figura 8. *Amplicones de distintas longitudes.*

A la izquierda electroforesis clásica y a la derecha electroforesis FIGE, ambas en gel de agarosa al 3 %, teñido con Sybersafe; 110V. Comparación entre métodos para la separación de fragmentos con pequeñas diferencias entre sus tamaños. PM: Peso molecular conocido, 13 fragmentos de 200 – 3,000 pares de bases (bp). Electroforesis clásica 1: DTU I – CBBcl3 con 337 bp, 2: DTU II – ESMcl3Z2 con 397 bp, 3: DTU IV – Can III (sin longitud) y 4: DTU VI – Tulacl2 con 383 bp. Electroforesis FIGE: 5 al 8 con el mismo orden de muestras.

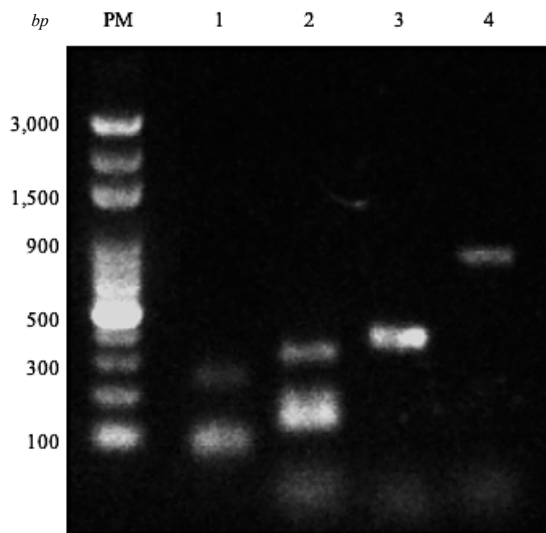


Figura 9. Amplicones de distintas longitudes.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Sybersafe; 110V, 50 min. ADN cepa Tulacl2. Verificando la actividad de los marcadores moleculares a 58°C, Tm óptimo. PM: Peso molecular conocido, 13 fragmentos de 100 – 3,000 pares de bases (bp). Correspondiendo 1: Mito 1, 2: Mito 2, 3: Hypo y 4: CFLR.

Discusión

Selección in silico de candidatos para marcadores

En la presente investigación se diseñaron *in silico* marcadores moleculares (*Anexo I y III*) con la capacidad de amplificar varios genes nucleares específicos de *T. cruzi* (*Tabla II* en resultados). Tres de ellos, en conjunto con las enzimas de restricción seleccionadas también vía computadora, pueden diferenciar entre los *DTUs* I, II, y VI del parásito.

En cuanto a los tres juegos inanes, se hipotetizó que pueden deberse a polimorfismos en las zonas de *ADN* a amplificar; no a causa de un mal diseño computacional (ya que este fue numerosas veces corroborado), sino porque durante el diseño se trabajó con los cuatro genomas secuenciados actualmente, siendo dos de ellos del mismo linaje; por lo que el cambio de nucleótido puede encontrarse en los genomas faltantes en el banco de genes. Otros motivos son, temperaturas de anillamiento más bajas, lo que genera pérdida de especificidad. Que el *ADN* utilizado no presente dichos genes o que aquella sección del genoma no se encuentre en buena calidad.

Caracterización de marcadores moleculares

Durante la caracterización de las secuencias identificables diseñadas, se demuestra que cada uno de los oligonucleótidos es funcional en al menos siete cepas de cultivo del parásito; por ser la cantidad en la que fueron probados. En las cuales se incluyen los linajes I, II, IV, V y VI. Además, se demostró su efectividad en muestras biológicas, provenientes de chinches (*D. maxima*) infectadas, colectadas en La Paz, B.C.S.

El resultado obtenido para los amplicones de los genes Amino acid permease-like protein (clave AAP), Ammonium transporter (clave AMT), Cystathione beta synthase (clave CBS), Cystathionine gamma lyase (clave CLG1), Diacylglycerol acyltransferase (clave DA1), Glycine synthase (clave GLY), Hypothetical protein (clave HYPO) y Thioredoxin putative (clave THIO) fue muy exitoso, ya que las bandas obtenidas son fuertes, marcadas y sin más formaciones de las esperadas (*Figura 2*). En cuanto al otro oligonucleótido de Cystathionine gamma lyase (clave CGL2), las bandas correspondientes a las dos cepas para el linaje TcI trabajadas, son las más

tenues, empero son fácilmente distinguibles (*Figura 2*). Para el segundo marcador de Diacylglycerol acyltransferase (clave DA2) el linaje TcIV respecta al menos visible. Con Kinetoplastid membrane protein (clave KMP) se amplifican dos bandas extras al producto deseado (*Figura 2*), lo cual puede deberse a polimorfismos en zonas de anillamiento, o a causas previamente mencionadas. Todas las bandas de Pyrroline 5 carboxylate reductase (clave P5CR) son de baja nitidez, sin embargo, se observan congruentes a su tamaño según su peso molecular (*Figura 2*).

Especificidad de los marcadores diseñados

Para corroborar las predicciones teóricas, se realizó una prueba experimental donde se utilizan los cebadores en cuestión, con *ADN* extraído específicamente para este ensayo investigativo (*Figura 3* y *Tabla III* en resultados). Siendo todos los organismos de diferentes grupos taxonómicos, en distintos niveles, al de *T. cruzi*. En las 12 pruebas se confirma que ningún conjunto de marcadores amplifica a otro organismo distinto al de interés (*Figura 4*). Corroborando las pruebas que se realizaron en *BLAST* sobre la especificidad de los cebadores.

Posteriormente se amplificó *ADN* de muestras extraídas de chinches (*D. maxima*) infectadas por el parásito, donde el porcentaje de éxito fue total. No obstante, el bandeo del *ADN* de cultivo contra el silvestre es mucho más fuerte (*Figura 5*). En Diacylglycerol acyltransferase (clave DA2) y Thioredoxin putative (clave THIO) las bandas respectantes a *ADN* biológico son casi imperceptibles. Por otro lado, Kinetoplastid membrane protein (clave KMP) pierde el doble bandeo extra en la muestra silvestre.

Con el fin de comparar la efectividad de los marcadores propuestos, se incluyó un cebador frecuentemente utilizado y citado en estudios sobre identificación del protozoario, propio del gen TcSC5D, posiblemente un lathosterol episterol oxidasa (F 5'-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3', R 5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3').

En todas las muestras biológicas amplificadas se mostraron bandas nítidas, con tamaño esperado y similares en cuanto a características visuales.

Lo resultante tanto para el gen TcSC5D como para el resto de los oligonucleótidos es consistente. Las bandas obtenidas con template biológico son de menor grosor y fuerza, contrastándose con las de *ADN* de cultivo (*Figura 5*). Por lo que las herramientas moleculares que ofrecemos para detección para *T. cruzi*, pueden considerarse como buenos marcadores para éste, por lo que se alienta a utilizarlas en muestras de estos dos tipos. Además, dentro de algunos de los amplicones obtenidos hay polimorfismos que permiten diferenciar entre los linajes con genomas descritos.

Optimización con PCR Multiplex

Se obtuvieron tres *PCR Duplex* y dos *PCR Multiplex* exitosas en los linajes probados (TcI, TcII, TcIV y TcVI, siendo estos los únicos disponibles en el laboratorio actualmente).

Se probaron varias combinaciones de marcadores moleculares en una sola reacción, para optimizar el trabajo, tiempo y dinero con un solo *PCR plex* con suficiencia de detección. El rendimiento son cinco opciones con buen bandeo (*Figura 6*). Cabe mencionar que las pruebas se realizaron en *ADN* de cultivo debido a la limitación que ocasionó la poca disponibilidad de *ADN* silvestre. Para una de estas composiciones se eligieron los cuatro cebadores que, en conjunto con enzimas de restricción pueden diferenciar y/o discriminar algunos linajes de *T. cruzi* (*DTU* I, II y VI). Esto con la intención de utilizar las proteínas bacterianas en una reacción de *PCR plex*, y poder diferenciar en una sola vez el o los linajes presentes. Sin embargo, a causa de la baja fuerza visual que poseen las bandas, es difícil discernir el origen de los fragmentos. Pero en *PCR simple* las ocho endonucleasas seleccionadas, trabajan con efectividad en los tres genes amplificados. Por lo que se sugiere que, para la discriminación de linajes, es más factible el hacerlo en productos de *PCR simple* y no con las composiciones mencionadas anteriormente (*Anexo VI*).

Diferenciación por digestión enzimática

El servidor en línea *TriTrypDB* ofrece los genomas de los linajes Esm (Tc II), Non Esm (Tc VI), CL Brener (Tc VI), dos de Dm28c (Tc I), así como también de Sylvio (Tc I) y uno de *T. cruzi marinkellei* (Tc bat). De modo que los restantes linajes TcIII, TcIV y TcV son los mismos que faltan por probar con digestiones enzimáticas en el presente estudio. Ya que fue imposible

encontrar los mismos genes en los tres *DTU* ausentes, *ergo*, no se trabajó la búsqueda de enzimas de restricción para este grupo. Cabe aclarar que, entre el diseño y pruebas experimentales de los MM, se contemplaron todos los linajes actualmente descritos, excepto TcIII. Motivo por el cual, el trabajo se limitó naturalmente a utilizar los *ADN* TcI, TcII, Tc IV, TcV y TcVI en las demás pruebas, dejando la discriminación enzimática entre los linajes TcIII, TcIV y TcV fuera.

Los linajes identificados de *T. cruzi* fueron distinguidos de la siguiente manera: con CBS es posible distinguir el *DTU* I con dos enzimas distintas, mientras que *DTU* VI con una. En cuanto a DA1 se identifican *DTU* I, *DTU* II y *DTU* VI con tres distintas enzimas, y para AAP se utilizan tres enzimas más, capaces de discernir entre *DTU* II y *DTU* VI (*Tabla V* y *Figura 7*). También se encontraron enzimas que cortaran justo donde los polimorfismos de los amplicones de AMT, sin embargo, éstos resultan en fragmentos con tamaños tan similares que no es viable su práctica (*Anexo IV* y *V*).

Amplicones de distintas longitudes

Otro método para la identificación y/o diferenciación de linajes es por medio de amplicones de distintas longitudes. Siendo tres genes los elegidos: dos con función desconocida, Hypothetical protein y Mitochondrial *RNA* binding complex 1 subunit (*Anexo III*). Uno de los primeros conjuntos de moléculas, con clave HYPO, el único seleccionado para distinguir *DTUs*. Los dos cebadores del gen mitocondrial amplifican una banda extra, y la proteína hipotética con clave CFLR, presenta ocasionalmente el bandeo del amplicón, y al producirse se trata de una marca tenue (*Figura 9*). De modo que HYPO fue por mucho la mejor opción al mostrar un producto con repetitividad consistente, del tamaño esperado y con una considerable y útil cantidad de nucleótidos entre cada alineamiento.

El tamaño entre amplicones varió por no más de 60 nucleótidos (1: *DTU* I – cepa CBBcl3 con 337 *bp*, 2: *DTU* II – cepa ESMcl3Z2 con 397 *bp*, 3: *DTU* IV – cepa CAN III (sin longitud exacta porque este linaje no se alineó en *SeaView*, porque no está en *TriTrypDB*) y 4: *DTU* VI – Tulacl2 con 383 *bp*).

Se utilizaron geles de agarosa al 3 % y dos métodos de electroforesis, la clásica y la de inversión de campo. Los resultados fueron similares, la varianza entre los amplicones es apenas

distinguible; de modo que se recomienda necesario amplificar este gen en al menos dos linajes, siendo preferiblemente no el conjunto de DTU IV y VI, por su semejanza. Sino el resto de las combinaciones para poder apreciar claramente con este método el o los linajes presentes en las muestras trabajadas (*Figura 8*).

Finalmente, los tres conjuntos de secuencias diseñados que trabajan con ayuda de enzimas de restricción, no solo se recomiendan para la detección de infección vectorial, sino también para identificar cual es la cepa que generó la enfermedad. El resto de los marcadores, al igual que cualquier combinación plex, pueden ser útiles para diagnósticos. Quedando evidenciada su efectividad en muestras silvestres, mientras que, para la funcionalidad en muestras clínicas, se tiene una colaboración con la Dra. Teresa López del Centro Regional de Investigación en Salud Pública en Chiapas, para probar los oligonucleótidos propuestos en sueros humanos. Esto por la facilidad de conseguir los sueros infectados debido a la cantidad de casos de Chagas en dicha región. Por lo pronto, regresando a las muestras silvestres, se aconseja el uso de las composiciones sugeridas, ya que al contar con varias posibilidades a amplificar y por ser amplicones de cortos tamaños, es altamente favorable su rendimiento, inclusive en muestras de mala calidad, *e.g.* ADN degradado.

Con base en estudios previos, se sabe que el éxito en detección y tratamiento durante la fase aguda es mucho mayor que en las fases sub-aguda asintomática y crónica. Por lo que, durante la primera es cuando se recomiendan únicamente los estudios de detección molecular. Mientras que, para las otras dos, se sugiere aunando a lo anterior, el realizar biopsias de los posibles órganos afectados por los nidos en los que se mantiene *T. cruzi*, tras aproximadamente cuatro meses desde su primer contacto con el hospedante.

Las herramientas moleculares y protocolos que se ofrecen en el presente estudio, tienen la capacidad de aportar a la comprensión de los actuales problemas de la patogénesis, así como acercar a la comunidad científica a alguna de las tan necesarias y urgentes soluciones que requiere la zoonótica enfermedad del Chagas.

Conclusiones

1. Se diseñaron 15 marcadores moleculares, donde 12 son capaces de amplificar varios genes específicos de *T. cruzi*, donde tres de ellos, en conjunto con las ocho enzimas de restricción seleccionadas, pueden diferenciar entre los *DTUs* I, II, y VI del parásito.
2. Son necesarias tres enzimas restrictivas comerciales para diferenciar entre los tres linajes mencionados en el punto anterior.
3. El bandeo producido con *ADN* de cultivo es más fuerte que el amplificado con *ADN* silvestre.
4. Las combinaciones de cebadores para la técnica de *PCR* Multiplex no son efectivas para discriminar linajes en conjunto con enzimas de restricción, sin embargo, son eficientes para amplificar varios loci del genoma en una sola reacción.
5. Las distintas longitudes de los amplicones producidos por los marcadores con clave *HYPO* no son significativas para poder diferenciar entre linajes, independientemente de la técnica de electroforesis que sea utilizada.

Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis de Licenciatura, las perspectivas de trabajos futuros se orientan hacia la implementación de recursos, herramientas y técnicas que faciliten y mejoren la determinación de los linajes de *T. cruzi* y su relación con el tropismo y predisposición de la enfermedad. Ya que aun quedan diversos puntos que resolver y/o ahondar sobre los mecanismos e interacciones del parásito. Otro punto que sería interesante completar sería la prueba de los marcadores y enzimas de restricción propuestos, en muestras de mamíferos reservorios silvestres con distintas etapas de la patogénesis y verificar su efectividad funcional en otras áreas y procedencia de la muestra. Finalmente, dada la escasez de información actualizada en el tema, se espera contribuir al campo de estudio con los datos y herramientas moleculares aportados.

Anexos

Anexo I. Nombre de gen y loci utilizados para el diseño de marcadores moleculares.

Gen	Loci
Amino acid permease-like protein	Tc00.1047053510251.10
Ammonium transporter	Tc00.1047053508317.50
Cystathionine beta synthase	TcCLB.510535.60
Cystathionine gamma lyase	TCDM_00169
Diacylglycerol acyltransferase	TcCLB.507467.90
Glycine synthase	Tc00.1047053504017.40
Hypothetical protein	TcCLB.506575.9
Hypothetical protein	TcCLB.506479.67
Mitochondrial RNA binding complex 1 subunit	TcCLB.503603.10
Pyrroline 5 carboxylate reductase	Tc00.1047053506857.20
Thioredoxin putative	TcCLB.510227.29

Anexo II. Información sobre las cepas de cultivo utilizadas.

Cepa	DTU	Notas
Tulacl2	TcVI(IIe)	(Chile, Human)
PSC-O	TcV(IIId)	(Chile, human)
EV-13C	TcI	(Colombia, Rhodnius prolixus)
Can III	TcIV(IIa)	(Brazil, human)
CA-1-05	TcI	(Brasil, Triatoma pseudomaculata)
CBBcl3	TcII(IIb)	(Chile, human)
ESMcl3Z2	TcII(IIb)	(Brasil, human)

Anexo III. Secuencia y características de los 15 marcadores moleculares diseñados. Manufacturados por la empresa T4Oligo.

Gen	Secuencias (5' – 3')	Tamaños esperados (nt)	Temp (°C)	Polimorfismos
Amino acid permease-like protein	AAP-F: TCTCTCTGGGACCAATTCACG AAP-R: CGCCGTGAGACATGTAACAG	350	58	15
Ammonium transporter	AMT-F: TGCAGGTTGGCTGGTATTAC AMT-R: TCTCCAATAAACAGGGTGCTG	510	61	12
Cystathionine beta synthase	CBS-F: GAAGCCTGTGGCAAATTTA CBS-R: GCGGAGCAGTTTGAAGTAGC	591	59	10
Cystathionine gamma lyase	CGL-F1: GAAGCATTTGGTTTCCGACT CGL-R1: TGATCACCCGCACTCATAAA	333	61	8
Cystathionine gamma lyase	CGL-F2: ATCACCGATTGCAGTTACGG CGL-R2: CGTCTCCGAAAAGAACCAACT	150	60	4
Diacylglycerol acyltransferase	DA-F1: TTGACAGTAGCACGCAGAGG DA-R1: ACAGCACCTCGAGGATTTA	436	58	12
Diacylglycerol acyltransferase	DA-F2: CCCAACCCGTGCCGTA DA-R2: GGCCTTTGCCGGGTA	190	60	6
Glycine synthase	GLY-F: CGTTCTGCACAGTCTTCACC GLY-R: CCCCGCATTGATAACAGCAA	331	59	6
Hypothetical protein	HYPO-F: GCGTACACAGGTAGCGAGTG HYPO-R: AACCCACCAAAGAGGTGACA	337*, 397**, 383***	59	5
Hypothetical protein	CFLR-F: GTCTCCAGCATGGATTCTCC CFLR-R: CTTGCGACAAATCCAACG	848	58	17
Mitochondrial RNA binding complex 1 subunit	MITO-F: GGTGGGAACCGTAATAATCG MITO-R: ACCGTCAAATCCACCTCTTC	296	58	25
Mitochondrial RNA binding complex 1 subunit	MITO-F2: GGGGATAAACAGTCCCTGCTG MITO-R2: CGTCAAATCCACCTCTTCCA	399	58	29
Kinetoplastid membrane protein	KMP-F1: ATGGCCACCACCTCTTGAGG KMP-R1: ACTCAGCAAAATTTGGCCCTTG	238	61	6
Pyrroline 5 carboxylate reductase	P5CR-F: ATGCCGTTTGTTCAGTGGTC P5CR-R: GCGTTTGGTGTGACAGAAAGT	190	61	5
Thioredoxin putative	Thio-F1: TTTTTGCCGAGGCACCTTC Thio-R1: CGTGGCTTGGGAGAGAGAAGA	464	58	8

Nota: Tamaño de amplicones para * DTU I, ** DTU II y *** DTU VI.

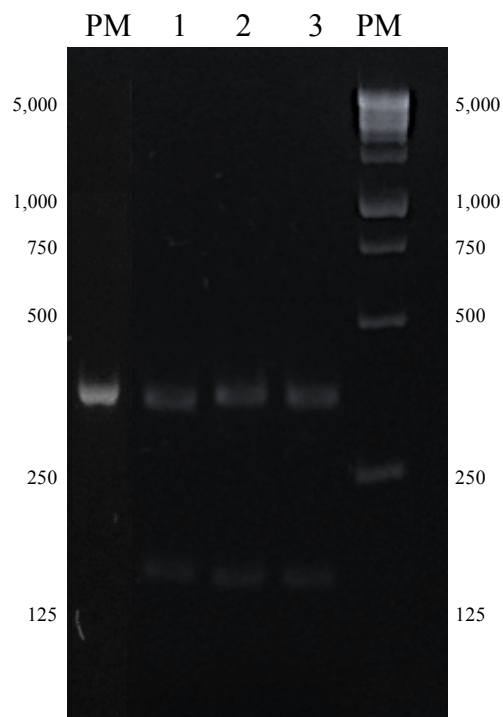
Anexo IV. *Enzimas de restricción seleccionadas para el amplicón correspondiente al gen Ammonium transporter.*

Enzima de restricción, linaje identificado por corte enzimático (LIPCE) y secuencias, disolución amortiguadora óptima para escisión, posición en nucleótidos de corte en el amplicón y tamaños de fragmentos en nucleótidos tras digestión. En la segunda columna se mencionan primero los linajes que se distinguen o discriminan con ayuda de las enzimas de restricción, tras el guión se refiere a los que pueden inferirse.

GEN	<i>Ammonium transporter</i>					
Enzima	Identifica	Secuencia 5' a 3'	Secuencia 3' a 5'	Amortiguador	Posición	Tamaños esperados (nt)
NcoI	I - II y VI	CCATGG	GGTACC	3	154	154 y 356
Acc65I	I	GGTACC	CCATGG	3	160	160 y 350

Anexo V. *Electroforesis en gel de agarosa al 3 %, teñido con Sybersafe; 110V, 60 min.*

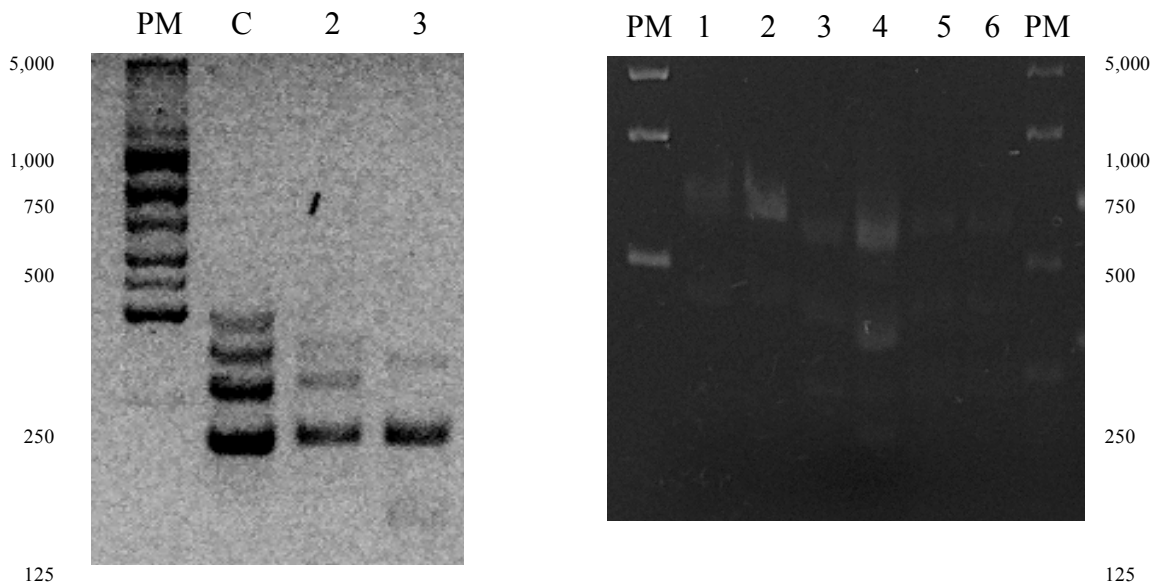
Demostración de los fragmentos obtenidos tras la digestión realizada por las tres enzimas de restricción seleccionadas para el amplicón correspondiente al gen Ammonium transporter. Siendo 1: CBBcl3 + NcoI, 2: Tulacl2 + NcoI y 3: CA-1-05 + Acc651. PM: Peso molecular conocido, 12 fragmentos de 125 – 5,000 pares de bases.



Anexo VI. Electroforesis en gel de agarosa al 3 %, teñido con Sybersafe; 110V, 60 min.

Demostración de los fragmentos obtenidos tras la digestión realizada por las tres enzimas de restricción seleccionadas para los amplicones en la combinación de Mutiplex (Cystathione beta synthase, Ammonium transporter, Diacylglycerol acyltransferase (1) y Amino acid permease-like protein).

Siendo 1: Multiplex control (sin enzimas agregadas), 2: enzima BseYI agregada, 3: BseYI, AccI y SalI agregados, 4: AvaII y SauI agregados, 5: AvaII, AluI y FauI agregados y 6: AvaII, AluI y BstZ17I agregados. PM: Peso molecular conocido, 12 fragmentos de 125 – 5,000 pares de bases.



Anexo VII. BLAST para especificidad de KMP en NCBI

Sequences producing significant alignments:

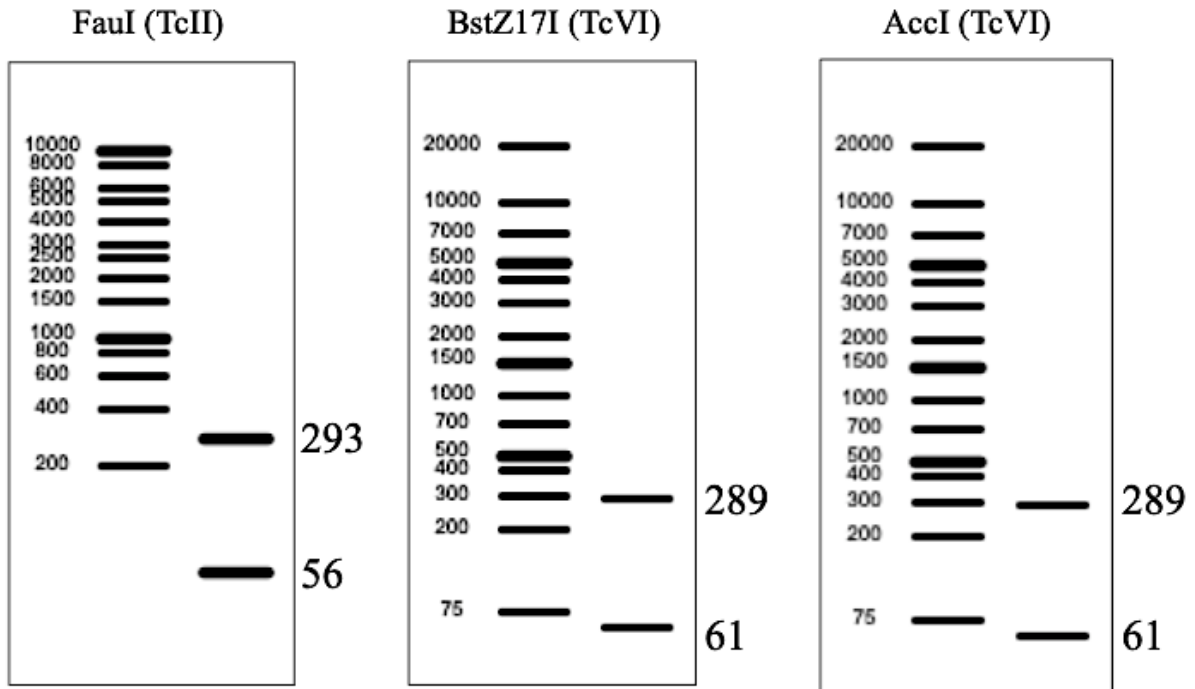
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

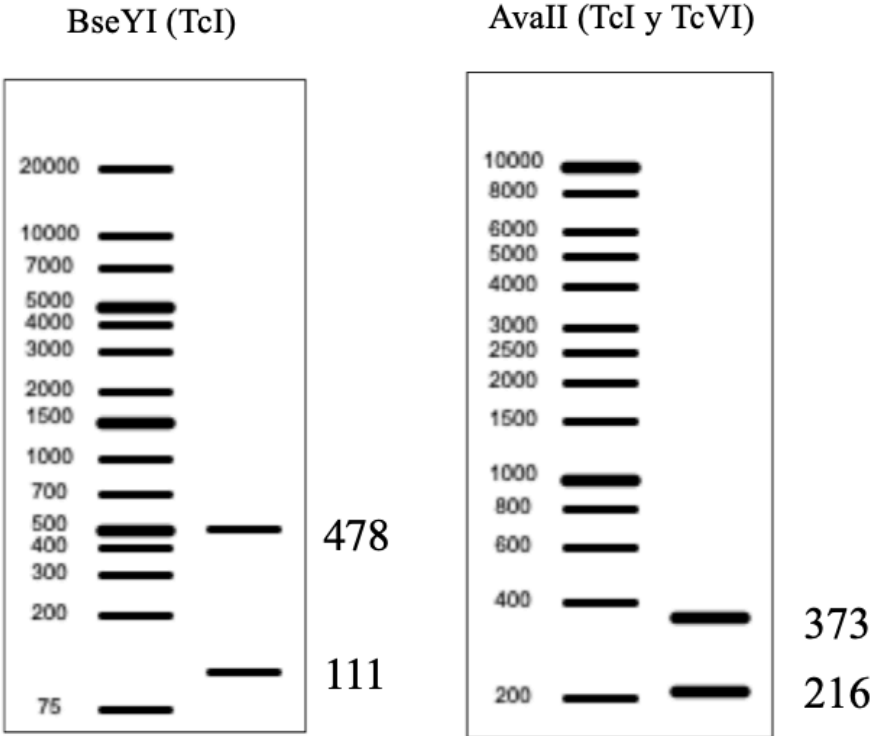
	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain Sylvio X10/c11 chromosome Tc119 sequence	712	1888	100%	0.0	100.00%	CP015669.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi KMP11 (KMP11).gene, complete cds; intergenic spacer, complete sequence, and KMP11 (KMP11).gene, partial cds	361	974	100%	1e-95	98.54%	AH008347.2
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi mRNA for kinetoplastid membrane protein-11	351	351	67%	6e-93	91.25%	AJ000077.2
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain CL Brener kinetoplastid membrane protein KMP-11 partial mRNA	265	265	37%	1e-66	99.32%	XM_803772.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain CL Brener kinetoplastid membrane protein KMP-11 partial mRNA	259	259	37%	5e-65	98.64%	XM_805396.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma rangeli isolate 5048 kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11).gene, complete cds	257	257	38%	2e-64	97.99%	DQ194345.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma rangeli kinetoplastid membrane protein 11.gene cluster, partial sequence	257	257	38%	2e-64	97.99%	AY325812.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain CL Brener kinetoplastid membrane protein KMP-11 partial mRNA	257	257	38%	2e-64	97.99%	XM_805395.1
<input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain CL Brener kinetoplastid membrane protein KMP-11 partial mRNA	183	183	25%	3e-42	100.00%	XM_803775.1

Anexo VIII. Esquemas vía in silico por Serial Cloner donde se presentan los tamaños de amplicones esperados tras digestiones enzimáticas.

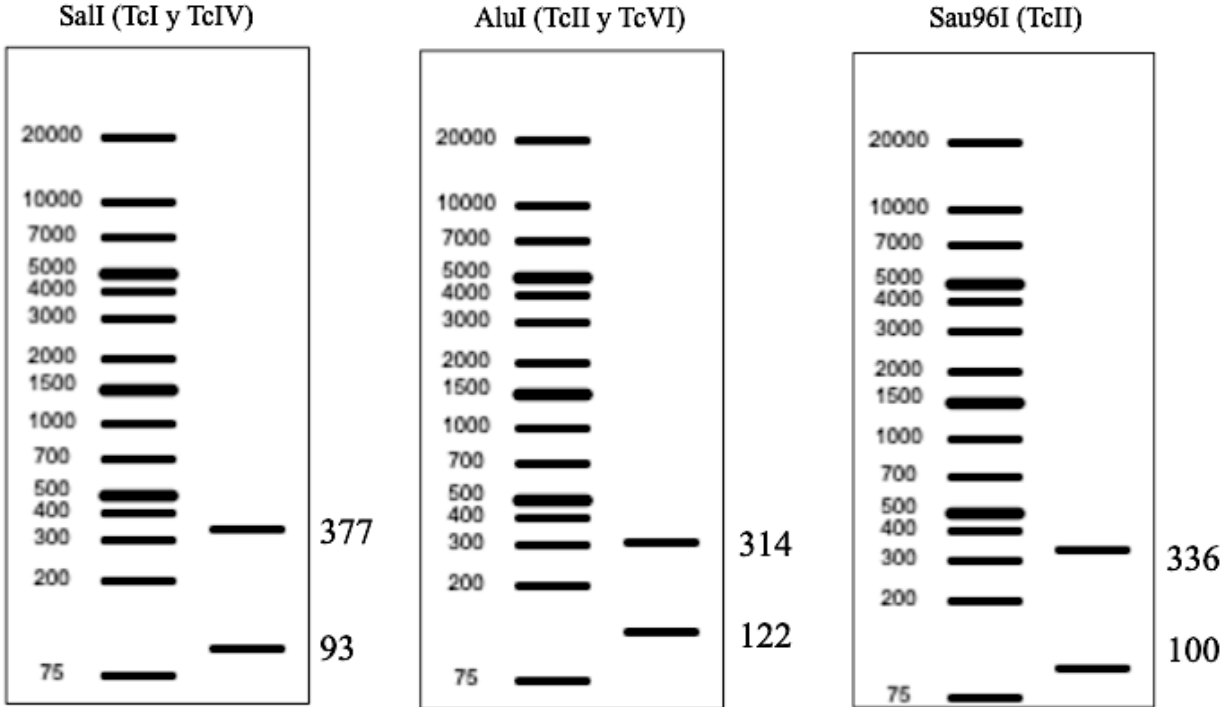
Amino acid permease-like protein



Cystathione beta synthase (CBS)



Diacylglycerol acyltransferase (1)



Literatura citada

- Alina, C. (2013). Tripanosomiasis americana en estudiantes latinoamericanos. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. www.medigraphic.com/pdfs/medicocamaguey/amc-2013/amc134c.pdf
- Alves, M. J. M., & Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*, 59(4–5), 274–279; Doi.org/10.1080/15216540701200084
- Apt, W., Hernández, E., Jersic, M., Muñoz, P., Hauck, I., Olea, A., Rivera, M., Torres, M.; Zulantay, I. (2006). Prevención y control de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 5.
- Araujo-Jorge, T. C., Telleria, J., Rios-Dalenz, J. (2010). History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp.3 - 23) Elsevier.
- Aslett et al. *TriTrypDB*: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae *Nucleic Acids Research* 2010 38 (Database issue): D457-D462; Doi:10.1093/nar/gkp851
- Assumpção, T. C. F., Charneau, S., Santiago, P. B. M., Francischetti, I. B. M., Meng, Z., Araújo, C. N., Pham V. M., Queiroz, R. M. L., Nery de Castro, C., Ricart, C. A., Santana, J. M., & Ribeiro, J. M. C. (2011). Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. *Journal of Proteome Research* 10 (2), 669-679; Doi: 10.1021/pr100866h
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., ... Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2034–2039; Doi.org/10.1073/pnas.0307312101
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *The Lancet*, 362, 1469–148; Doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6
- Brise, S.; Dujardin, J.C.; Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:347-382.
- Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Neto, M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda edição. Ed. Guanabara Koogan.
- Bhatia, V., Wen, J. J., Zacks, M. A., Garg, N. J. (2009). American Trypanosomiasis. *Vaccines*

- for Biodefense and Emerging and Neglected Disease. Academic Press (Eds.) (pp. 1423 - 1450) *Elsevier*.
- Carabarin, A., González, M., Rodríguez, O., Baylón, L., Rosales, J.L, Reyes, P., Arce, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*. Elsevier.
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., & Vinas, P. (2011). Congenital chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), 4–6; Doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. www.goo.gl/gBy5V3
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) - What are the signs and symptoms of Chagas disease? www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html#intro
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) - Epidemiology & Risk Factors <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>
- Ceballos, L. (2010). Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina. U. Buenos Aires, Facultad de Cs. Exactas y Naturales. pp. 8-10.
- De Lana, M., Marques, E. (2010). Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp.339 - 363) Elsevier.
- Dorn, P. L., McClure, A. G., Gallaspy, M. D., Waleckx, E., Woods, A. S., Monroy, M. C., & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), 1–15; Doi.org/10.1371/journal.pntd.0005878
- Dumonteil, E. (1999). Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 41(4), 322–327; Doi.org/10.1590/S0036-36341999000400010
- Elnifro, E.; Ashshi, A.; Cooper, R.; Klapper, P. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4) 559-570; Doi 10.1128/CMR.13.4.559

- Arriagada, K. (2014). Tipificación de linajes de *Trypanosoma cruzi* en individuos con enfermedad de chagas cardíopatas y no cardíopatas. Santiago, Chile. Proyecto FONDECYT 1120382
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., ... Andersson, B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733), 409 LP-415; www.science.sciencemag.org/content/309/5733/409
- FAO. (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf
- Fernandes, M.C., Andrews, N. W. (2013). Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. National Institutes of Health. *FEMS Microbiol.* 36(3): 734–747; Doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.
- Flores, C.; Machado, C. (2011). Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8); Doi.org/10.1371/journal.pntd.0001272
- García, A. (2011). Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* y estudio epidemiológico molecular de clones involucrados en la infección transplacentaria en Chile. *Intra. Med.* pp 2:1-6.
- Gill-Langarica, Homar René, & Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl. (2008). Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 164-176; www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200009&lng=es&tlng=es.
- Gómez, A., & Monteón, V. M. (2008). Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3–4), 103–118.
- Grisard, E. C. (2002). Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1, 5; Doi.org/10.1186/1475-9292-1-5
- Guhl, F. (2013). Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Española de Salud Pública*, 1–8; Doi.org/10.1128/JCM.44.5.1645
- Higuera, S. L., Guhl, F., & Ramírez, J. (2013). Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*, 6(1), 112; Doi.org/10.1186/1756-3305-6-112

- Hontebeyrie, M., Truyens, C., & Brenière, S. F. (2010). Pathological Consequences of Host Response to Parasite. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp.669 - 690) Elsevier.
- Imbert, J.L.; Figueroa, A.H.; Gómez, J.V. (2003). Tripanosomiasis americana o mal de Chagas. Otra enfermedad de la pobreza. *Elementos*. 10. (pp. 13).
- Kowalska, A.; Kowalski, P; Torres, M. (2011). Chagas disease - American tripanosomiasis. *Pol. Ann. Med.* 18(1):156-167.
- Jansen, A. M., Rodrigues, A. L. (2010). Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp. 249 - 276) Elsevier.
- Lefebvre, V., and Chevre, A.M. (1995). Tools for marking plant disease and pest resistance genes, a review. *Agronomie* 15:3–19
- Lee, J. J., Leedale, G. F., Bradbury, P. (2000). Illustrated Guide To The Protozoa. *Society of Protozoologist*, Vol 1. 2nd Ed. Allen Press.
- Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63), e3998; Doi:10.3791/3998
- Lulitanond, V., Intapan, P. M., Tantrawatpan, C., Sankuntaw, N., Sanpool, O., Janwan, P., & Maleewong, W. (2012). Molecular markers for detection and differentiation of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in human blood samples by pyrosequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1455–1457; Doi.org/10.1128/JCM.06001-11
- Manne JM, et al. (2013). Barriers to Treatment Access for Chagas Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(10): e2488; Doi:10.1371/journal.pntd.0002488. Creative Commons atribución México 2.5
- Ministerio de Salud. (2010). Guía Clínica “Guías de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas”. Santiago, MINSAL.
- Mitelman, J., Gimenez, L., Corvalán, D., Lifschitz, A. and Mosca, W. (2011). Enfermedad de Chagas Mazza en las grandes ciudades. *IntraMed*, p.Capítulo II; www.intramed.net/sitios/libro_chagas/capitulos.htm.
- Nagajyothi, Fnu et al. (2013). Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *National Institutes of Health. Cell Microbiol.* 14(5): 634–43. Doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x.
- Organización Panamericana de la Salud. (s/a). Información general: Enfermedad de Chagas.

www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es

- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402; Doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Rassi, A., Porto, C.C., Rezende, J.M., (1978). Doença de Chagas. Amato Neto, V., Baldy, J.L.S., (eds). *Doencas transmissíveis*. Rio de Janeiro: Guanabara Koggan 107-128.
- Reis-Cunha, J.L. et al. (2018). Whole genome sequencing of *Trypanosoma cruzi* field isolates reveals extensive genomic variability and complex aneuploidy patterns within TcII DTU. *MC Genomics*; Doi.org/10.1186/s12864-018-5198-4
- Reyes López, Pedro A. (2009). La vida y obra de Carlos Chagas a cien años de la descripción de la enfermedad de Chagas-Mazza. *Archivos de cardiología de México*, 79(4), 237-239. www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402009000400001&lng=es&tlng=es.
- Rodriguez, I. G., & Loaiza, J. R. (2017). American trypanosomiasis, or Chagas disease, in Panama: a chronological synopsis of ecological and epidemiological research. *Parasites & Vectors*, 10(1), 459; Doi.org/10.1186/s13071-017-2380-5
- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., ... Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 59(3), 6–16.
- Stevens, J. R. et al. (1999). The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *T. brucei* and *T. cruzi*, *Parasitology*, 118:107-116.
- Stevens, J., Gibson, W., (1999). The molecular evolution of *Trypanosoma*, *Parasitology Today*, 15: 432-437.
- Storino, R. Milei, J. (1994). Enfermedad de Chagas. Editorial Doyma. Argentina S.A.
- Truyens, C. and Carlier Y. (2010). Protective Host Response to Parasite and Its Limitations. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp. 601 - 668) Elsevier.
- Tibayrenc, M. (2010). Human Genetic Susceptibility to Chagas Disease. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp. 691 - 706) Elsevier.
- Verweij, J. J., & Rune Stensvold, C. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 371–418; Doi.org/10.1128/CMR.00122-13

- Ward Brian; Ndao Momar et al. (2002). Specific biomarkers for various parasitic infections. *Weekly Epidemiological Record* 77:300-304
- Weiss, J. B. (1995). DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 113–130; www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
- Werner, Apt. (2010). Treatment of Chagas Disease. Jenny Telleria, Michel Tibayrenc (Eds). *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. (pp. 809-825) Elsevier.
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 90:33-43
- World Health Organization (WHO). 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis): What is Chagas disease?
- World Health Organization (WHO). (2018). Neglected tropical diseases. www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
- World Health Organization (WHO). (2019). Chagas disease (American trypanosomiasis): Key Facts. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Zingales, B. et al. (2009). A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific No- Menclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to Tc. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104. 1051–54. www.scielo.br/pdf/mioc/v104n7/21.pdf.
- Zingales, B. et al. (2012). The Revised *Trypanosoma cruzi* Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications. *Infection, Genetics and Evolution* 12(2): 240–53; [Doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009).
- Zingales, B. et al. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica* 184. 38-52; [Doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017)