



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS**



FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

TESIS

**“Variabilidad genética de Unidades Discretas de Tipificación I
(DTU I) basado en el gen que codifica la proteína de choque
térmico 70 de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN MEDICINA MOLECULAR

P R E S E N T A:

Biol. Kenia Lizeth Bastidas Leal

Director de Tesis
M en C. Verónica Chávez López

Co-Director de Tesis
Dra. Luz María González Robledo

Cuernavaca, Morelos, México a 17 mayo del 2023.

Cuernavaca, Morelos, México 17 mayo del 2023.

Comité Tutorial

M. Verónica Chávez López, Tutor Principal

Dr. Luz María González Robledo, Co-tutor, Tutor personal

Dr. Jorge Fraga Nodarse

Dr. Luis Cañedo Dorantes

Comisión Revisora Tesis y Jurado de Examen

Presidente: Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1er. Vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

2do. Vocal: M. en C. Verónica Chávez López

3er. Vocal: Dra. Luz María González Robledo

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en colaboración con el Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto Pedro Kouri de la Habana, Cuba. Se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 1101246, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Chimal por aceptarme y hacerme parte de su equipo de trabajo, gracias por las oportunidades y las experiencias que me permitieron crecer y aprender de la investigación.

Agradezco a la Dra. Luz María y la Mtra. Verónica Chávez por aceptar el compromiso de esta dirección de tesis, aun considerando que las circunstancias no fueron las ideales. A los miembros del comité de sínodos por brindarme su tiempo y dedicación en este escrito, al Dr. Fraga por continuar con el proyecto y por el seguimiento en su enseñanza sobre el gen *hsp70*. Al Dr. Cañedo por hacerme ver el enfoque clínico en el escrito.

Gracias a la Dra. Castañeda por abrirme las puertas de su laboratorio, ayudarme a mejorar mis presentaciones, trabajos y la motivación de culminar de la mejor forma. Al Dr. Acevedo por el apoyo y seguimiento de mi carrera.

*Escucha el consejo y acepta la corrección,
y al fin llegarás a ser sabio. Proverbios 19:20.*

DEDICATORIAS

A mi esposo Javier

Gracias por el apoyo emocional y la motivación que me diste en cada semestre que transcurría. Por adaptar mi propia oficina en casa y todas las estrategias que me ayudaron a tener un mejor desempeño durante la pandemia por COVID-19. Por tú compañía en el VI congreso de Chagas y el interés que despertó en ti, toda la temática de la enfermedad.

A mis papás Ismael y Elena por su apoyo y sus palabras de aliento en todo momento. A mis hermanos por el tiempo que me dieron para practicar mis presentaciones, mientras los tres aprendíamos a utilizar las nuevas plataformas en línea.

A Remy mi empujoncito para concluir a tiempo.

*Un corazón inteligente adquiere conocimiento,
y el oído de los sabios busca la ciencia. Proverbios 18:15*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS.....	ix
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Vectores y reservorios	3
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.3 Genética poblacional de <i>T. cruzi</i>	7
2.4 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas	8
2.5 Pruebas diagnósticas para la Enfermedad de Chagas	10
2.6 Genes utilizados para la determinación de linajes	13
2.7 Proteína de Choque Térmico 70kDa (<i>hsp70</i>).....	14
2.8 Unidades Discretas de Tipificación (DTU)	15
2.9 Unidades Discretas de Tipificación (DTU) en México	16
2.10 Haplotipos.....	19
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1 Variación intra específica de <i>Trypanosoma cruzi</i> I.....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	27
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	28
6. HIPÓTESIS.....	28
7. OBJETIVO GENERAL	28
8. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1 Diseño del estudio.....	29
8.2 Sedes del estudio.....	29
8.3 Criterios de selección.....	29
8.3.1 Criterios de inclusión.....	29
8.3.2 Criterios de no inclusión.....	30
8.3.3 Criterios de eliminación.....	30
8.4 Obtención de muestras.....	30
8.5 Selección de muestras	30

8.6	Purificación de productos de PCR <i>hsp70</i>	31
8.7	Secuenciación del producto de PCR <i>hsp70</i>	32
8.8	Alineamiento de secuencias	32
8.9	Análisis filogenético	33
9.	RESULTADOS.....	35
9.1	Descripción de la población de estudio	35
9.2	Secuenciación de productos de PCR	38
9.3	Alineamiento.....	39
9.4	Análisis filogenético	41
10.	DISCUSIÓN.....	44
11.	CONCLUSIONES.....	48
12.	PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS.....	49
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica <i>T. cruzi</i>	5
Tabla 2.	Clasificación de las divisiones de <i>T. cruzi</i>	7
Tabla 3.	Ventajas y desventajas de las técnicas de diagnóstico parasitológicas de la EC. ...	10
Tabla 4.	Asociación de DTUs <i>T. cruzi</i> y Ecotopos, Huéspedes y Patologías	18
Tabla 5.	Secuencias del gen <i>hsp70</i> citoplasmático de <i>T. cruzi</i> , <i>T. cruzi marikellei</i> , <i>T. rangeli</i> , <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i> utilizadas en el análisis filogenético	33
Tabla 6.	Resultados de las pruebas de PCR realizadas para confirmar la infección por <i>T. cruzi</i> y su linaje.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la EC	2
Figura 2. Distribución de triatomíneos en México.....	3
Figura 3. Ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 4. Morfología de <i>T. cruzi</i> y organelos que lo componen en diferentes estadios	5
Figura 5. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 6. Manifestaciones clínicas de la etapa aguda.....	8
Figura 7. Manifestaciones clínicas de la etapa crónica	9
Figura 8. Algoritmo para el diagnóstico de la EC en México	11
Figura 9. Proceso para el diagnóstico de la EC en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP).....	12
Figura 10. Genes utilizados para DTUs. Algoritmos utilizados para la tipificación.	13
Figura 11. Distribución geográfica de DTUs <i>T. cruzi</i> asociada a ciclos de transmisión	15
Figura 12. Distribución geográfica de DTU <i>T. cruzi</i> asociada a cardiomiopatía	18
Figura 13. Región de microsatélites 1	20
Figura 14. Región de microsatélites 2	21
Figura 15. Árbol filogenético sin raíces de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 16. Sitios polimórficos	23
Figura 17. Filogramas obtenidas según las distancias genéticas	24
Figura 18. Árbol consenso.....	25
Figura 19. Características de la población estudiada.....	35
Figura 20. Resultados del análisis serológico utilizando las pruebas de HAI y ELISA.....	36
Figura 21. Ciclo de transmisión al que pertenecen las muestras estudiadas	38
Figura 22. Gen parcial XM 812645.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL Brener <i>hsp70</i> ARNm..	39
Figura 23. Alineación de las secuencias del gen <i>hsp70</i>	40
Figura 24. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud de residentes de Morelos	42
Figura 25. Árbol consenso de Inferencia Bayesiana de residentes de Morelos	43

ABREVIATURAS

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
EC	Enfermedad de Chagas
DTU	Unidad Discreta de Tipificación (DTU, por sus siglas en inglés)
<i>hsp70</i>	Proteínas de Choque Térmico 70 kDa (<i>hsp</i> , por sus siglas en inglés)
kDa	kilodalton
CCC	Cardiomiopatía Chagásica Crónica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)
PCRTcTr	Reacción en Cadena de la Polimerasa dúplex <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Trypanosoma rangeli</i>
SNP	Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés)
RFLPs	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés)
Pb	Pares de bases
Nt	Nucleótido
mL	Mililitros
M	Molar
mM	Milimolar
µl	Microlitros
g	Gravedades
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés)
HAI	Hemaglutinación Indirecta
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
kDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial del kinetoplasto
SL-IR	Región Intergénica del gen mini-exón empalmado (SL-IR, por sus siglas en inglés)
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
TSSA	Pequeño antígeno de superficie del tripomastigote (TSSA, por sus siglas en inglés),
IgG	Inmunoglobulina G
H1	Histona 1
H3	Histona 3
1f8	Proteína de unión al calcio
Gp63	Glicoproteína de 63 kDa
Gp72	Glicoproteína de 72 kDa
<i>hsp60</i>	Proteína de choque térmico 60
F81	Felsenstein 1981
MCMC	Cadenas de Markov de Monte Carlo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

INSP Instituto Nacional de Salud Pública
InDRE Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
RNLSP Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública
LMTE- Laboratorio de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina
FM
IPK Instituto Pedro Kouri

1. RESUMEN

Antecedentes: La Enfermedad de Chagas (EC) es un problema de salud pública que afecta aproximadamente de 7 a 8 millones de personas en México y América Latina. Diversos estudios reportan que *Trypanosoma cruzi* presenta variabilidad genética cuya distribución es más variada en el Cono Sur. Hasta el momento se han genotipificado diferentes Unidades Discretas de Tipificación (DTU) que van de TcI a TcVII, así mismo a través de distintos marcadores moleculares se han encontrado reportes de variantes intra-linaje dentro de la DTU I. Sin embargo, el gen que codifica para la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) ha mostrado ser el marcador que mejor revela esta variabilidad, los cuales están mejor descritos para Colombia. En México existen pocos reportes de DTUs en infecciones humanas, en el que destacan las infecciones TcI, TcII e infecciones mixtas. Respecto a la variación en TcI en México, solo se tiene reportes de la región suroeste del país.

Objetivo: determinar la variabilidad genética de DTU I utilizando el un fragmento del gen *hsp70* citoplasmático de *T. cruzi*.

Metodología: A una colección de 26 muestras de participantes residentes del Estado de Morelos con EC confirmada por pruebas PCR y a las que se les realizó pruebas serológicas y con DTU I confirmado se les realizó la purificación y secuenciación de productos de PCR de un fragmento de 500 pb del gen de la proteína *hsp70*. Posteriormente se realizó el análisis bioinformático para identificar la variación intra-linaje DTU I.

Resultados: Se logró la secuenciación de 24 de las muestras. El análisis bioinformático del alineamiento de los productos de PCR no mostró variación en las secuencias. El modelo evolutivo que mejor se ajustó a la matriz de datos fue “Felsenstein 1981 (F81)” y proporción de sitios invariantes. Se obtuvieron árboles consenso por Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, este último mostro una relación cercana al aislado X67716.1 de Brasil.

Conclusiones: El análisis bioinformático de 24 muestras obtenidas de aislados de ex donadores de sangre y participantes voluntarios del Estado de Morelos con registro de DTU I no mostró variabilidad genética intra-clado.

Palabras clave: *T. cruzi*, *hsp70*, DTU I, haplotipos, ciclos de transmisión.

2. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (EC) o también llamada Tripanosomiasis Americana (TA) es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Esta se considera un problema de salud pública debido su forma asintomática y su lenta evolución clínica que terminan en afecciones crónicas en el sistema cardíaco y digestivo. Su falta de atención hace que se catalogue dentro de las enfermedades destendidas (1).

Se considera endémico en 21 países de América Latina, donde se estima que afecta de 7 a 8 millones de personas (2). En México se tiene una estimación que 1.1 millones de personas son afectadas por esta enfermedad, en 2018 los Estados de con mayor incidencia fueron Yucatán (0.8), Quinta Roo (0.8), y Nayarit (0.7) (3). La EC se considera una patología emergente en países no endémicos debido a las constantes migraciones, y casos importados asociados a la transfusión sanguínea (4,5) , y se estima que alrededor de 110 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (6) (Figura 1).

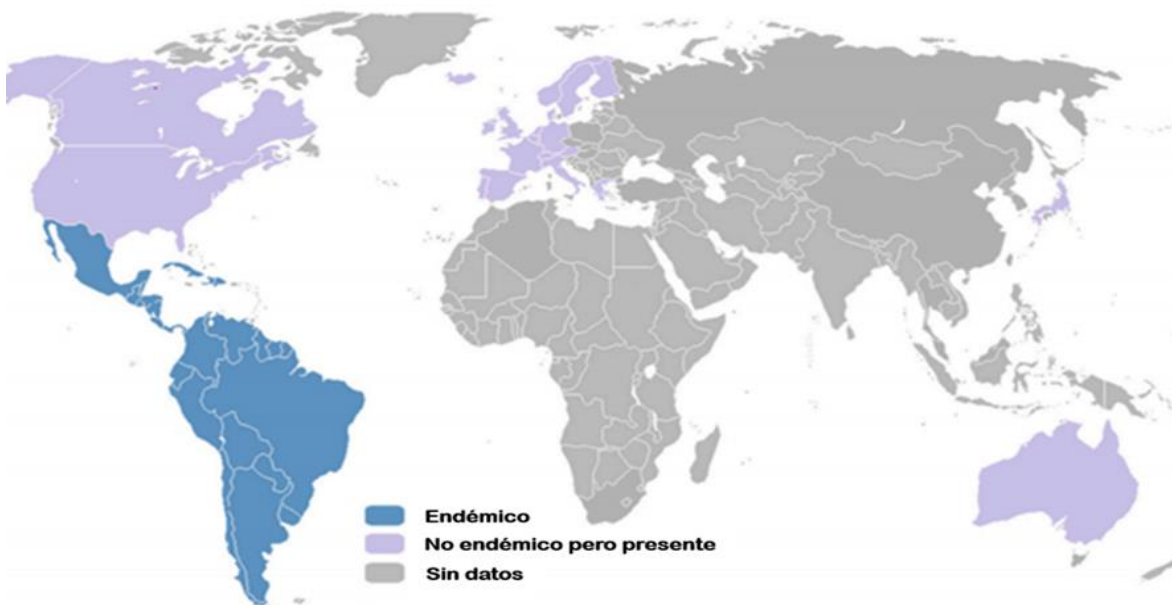


Figura 1. Distribución geográfica de la EC. En azul los países donde los vectores son endémicos, en morado se reporta la presencia de EC pero no hay presencia de vectores. Tomado de Sangenito *et al.*, 2020.

Las principales formas de transmisión en México son, la vía vectorial que ocurre en el 90% de los casos, mientras que el segundo tipo de transmisión es el de la transfusión sanguínea (3,7). Seguido de la transmisión congénita (8–10).

2.1 Vectores y reservorios

En México se conocen 8 géneros de triatoma autóctonos y 31 especies de triatomos importantes (3,6) de los cuales se consideran que 19 especies tienen importancia epidemiológica por la infección natural que tienen con *T. cruzi* (11). De estas han sido descritas 13 especies (2 domésticos y 11 peridomésticos) (12).

Las especies que invaden el ciclo de transmisión doméstico son *Triatoma barberi*, el cual se ha relacionado con problemas de miocardiopatías y dilataciones del tracto digestivo, y *Triatoma dimidiata* que también es asociada con cardiomiopatías (3). Los triatomos vectores *Meccus longipennis*, *M. mazzottii*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dypetalogaster máxima*, *Panstrongylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus* son las especies peridomésticas (12). Los triatomos importantes para el Estado de Morelos son *Triatoma barberi* y *Meccus pallidipennis* (6). Las principales especies de triatomos identificados en México se muestran en la Figura 2.

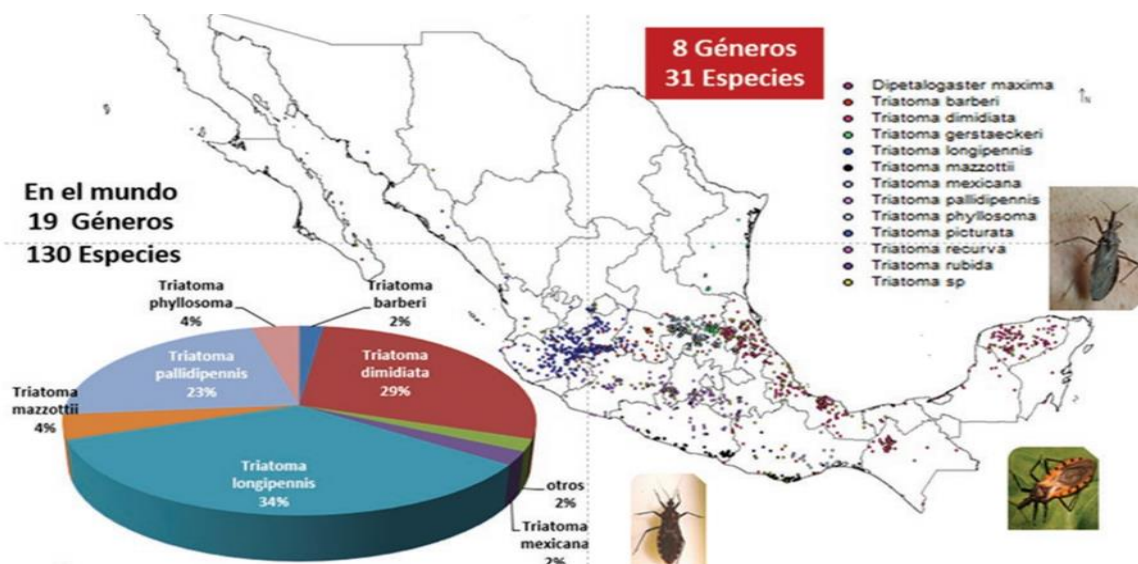


Figura 2. Distribución de triatomos en México, 2015. Se observa las 13 especies de triatomos con importancia epidemiológica y su respectiva ubicación en la república mexicana. Tomado de Rojo-Medina, 2018.

En la EC las asociaciones huésped-parásito se llevan dentro de tres diferentes ciclos de transmisión; el ciclo silvestre es donde el parásito circula desde mamíferos silvestres pequeños a grandes, así como vectores infectados. El ciclo doméstico es aquel donde se

involucra el humano, algunos mamíferos domésticos e insectos vectores que se encuentren en la vivienda. Mientras que el ciclo peridoméstico se puede ver una superposición entre los ecotopos silvestre y doméstico por donde *T. cruzi* circula entre las especies de mamíferos silvestres, sinantrópicos y domésticos, además este ciclo es el que continúa incrementándose derivado de la urbanización. (13) (Figura 3).

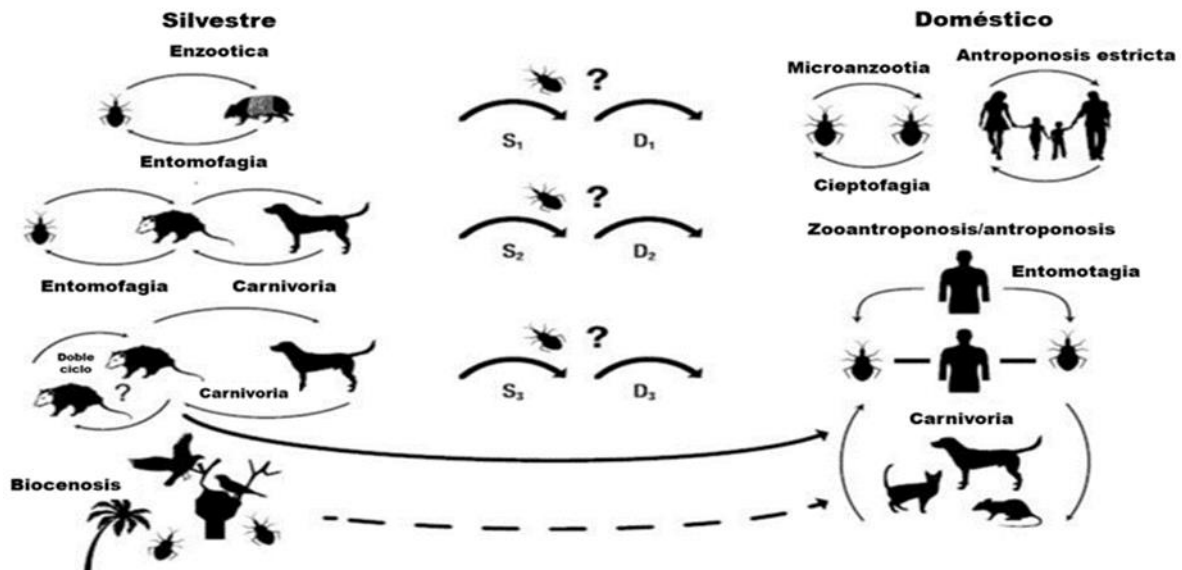


Figura 3. Ciclos de transmisión de *T. cruzi*. Ciclo silvestre con la circulación enzoótica del parásito, ciclo doméstico con parásitos que circulan en la zooantropoonosis, antropozoonosis, antropoonosis estricta o en micro enzootias. Sub-ciclos silvestres (S_n), sub ciclos domésticos (D_n). Los signos de interrogación señalan la incertidumbre en el proceso. La línea punteada señala rutas hipotéticas. Tomado de Herrera, 2014.

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida subgénero Schizotrypanonum (Tabla 1), el cual presenta un núcleo elipsoidal vesiculoso con doble membrana porosa.

Tabla 1. Clasificación taxonómica *T. cruzi* (Levine et al., 1980)

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Sub-Phylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Sub-Género	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Cruzi</i>

Su kinetoplasto es una estructura discoide con tres espirales de ADN-fibrilar, circular y lineal (k-ADN) que están dentro de una cápsula de la mitocondria y comprende el 20% de ADN del parásito, su único flagelo tiene una microestructura molecular típica de nueve pares de subunidades, presenta etapas de epimastigote, tripomastigotos en forma de C o S, (Figura 4).

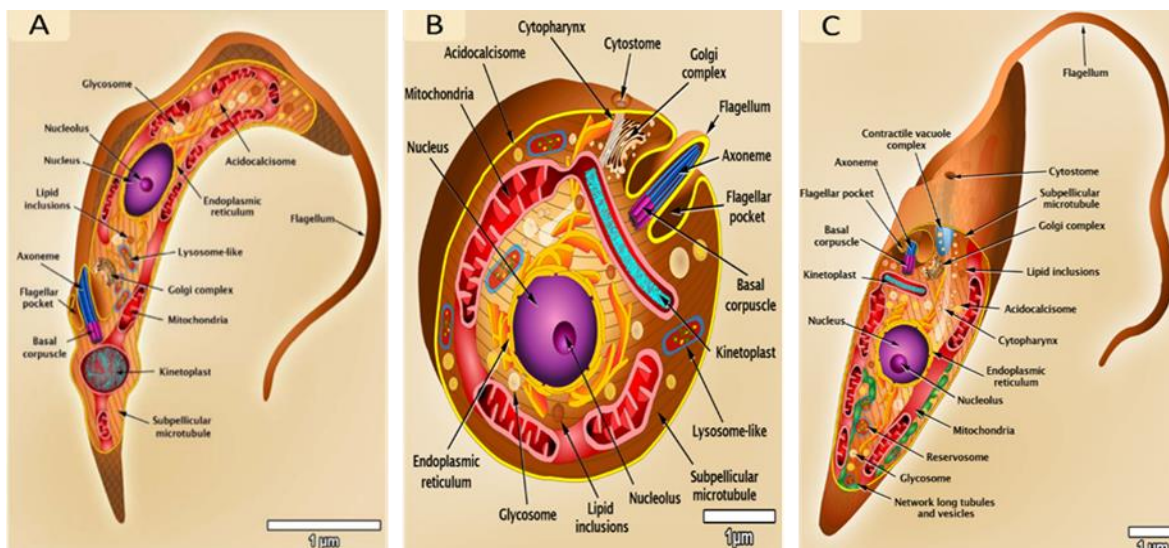


Figura 4. Morfología de *T. cruzi* y organelos que lo componen en diferentes estadios. Se aprecia el cambio de posición de algunos organelos de acuerdo a cada una de las etapas de desarrollo. En A) trypomastigote, B) amastigote, C) epimastigote. (doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749.g004>).

Cuando el parásito infecta fibras del músculo cardíaco estriado o fagocitos, se acorta el flagelo y se transforma en amastigote (14).

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* inicia a través de la picadura del vector, este deposita sus heces infectadas cerca al sitio de la picadura, a través del rascado entran los tripomastigotes metacíclicos, estos invaden las células que rodean al sitio de infección, perdiendo el flagelo y diferenciándose en amastigotes que se multiplicarán por fisión binaria. Los amastigotes intracelulares se transforman nuevamente en tripomastigotes, lisando a la célula y liberándose al torrente sanguíneo, entrando a una etapa infectante porque un nuevo triatomino se alimenta de esta sangre contaminada, y también a una etapa de posible diagnóstico. En el estómago del insecto, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes y se dividen de forma longitudinal dando lugar a los tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del vector. Terminando nuevamente en la forma infectante para un nuevo huésped y de esta forma inicia el nuevamente el ciclo (15)(Figura 5).

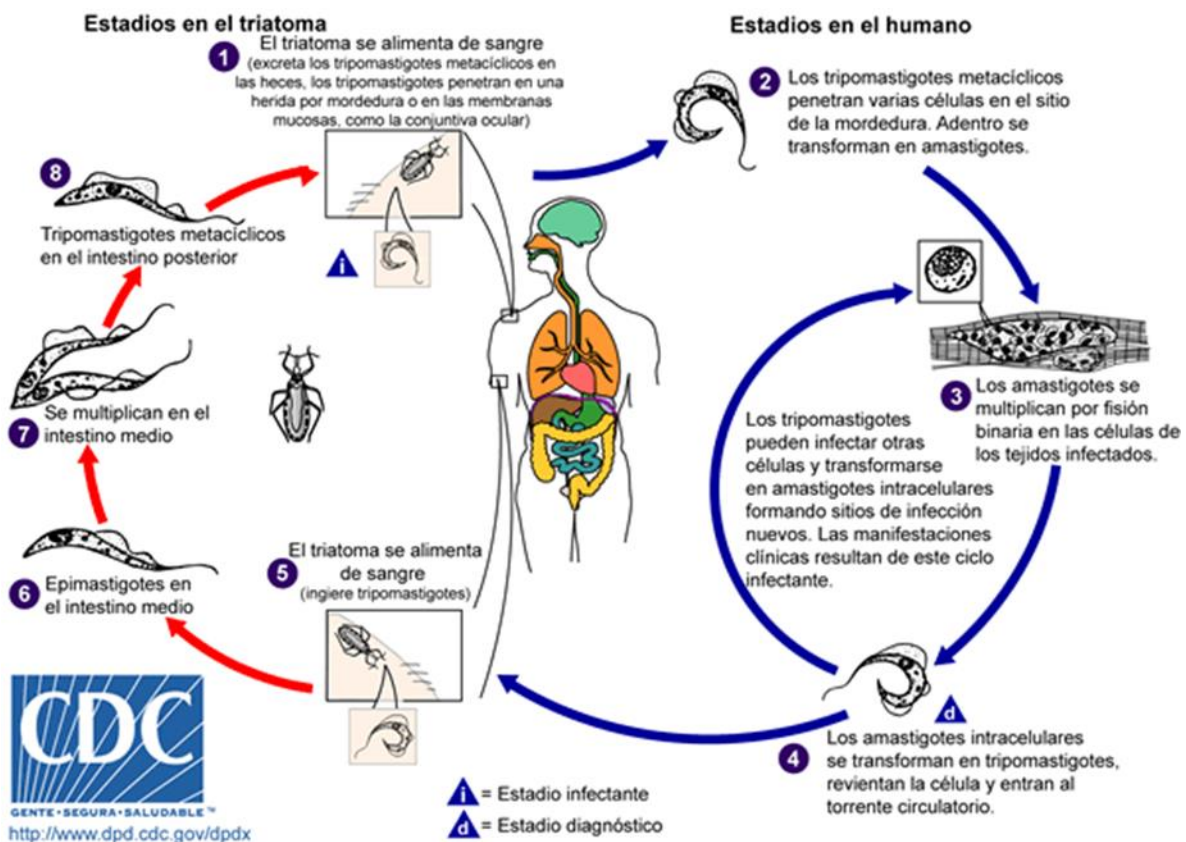


Figura 5. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se pueden ver los estadios de *T. cruzi* en el humano y el vector (tomado de CDC, 2019).

2.3 Genética poblacional de *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* es altamente compleja debido a la gran variedad biológica, junto con la complejidad ecológica de los vectores y los más de 70 géneros de huéspedes mamíferos que abarcan desde el sur de Estados Unidos al cono sur de Argentina. Genéticamente es muy diverso, y parte de la comprensión de la población de este parásito está en las distintas formas de clasificarlo o nombrarlo para tener definido el gran número de subgrupos (16).

Souto en 1996 divide al *T. cruzi* en dos linajes; TcI y TcII, en el que se creía que TcI era un grupo más conservado, mientras que el TcII resultaba ser un grupo más divergente.

Más tarde, con ayuda de las unidades discretas de tipificación (DTU) que se definen como conjunto de poblaciones genéticamente más cercanas entre sí (Tybayrenc et al., 1998), se propone la subdivisión del grupo TcII en cinco linajes: TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId, TcIIe (Brisse et al., 2001).

A través de un consenso internacional en 2009 se definió que estas DTU de *Trypanosoma cruzi* se clasificarán en TcI- TcVI (17) Durante el mismo año (18) realizaron un análisis de aislamientos de *T. cruzi* en murciélagos provenientes del área amazónica y áreas urbanas del centro de Brasil donde observaron que las relaciones filogenéticas entre los linajes de *T. cruzi* utilizando genes del miniexón, el grupo que correspondía a TcII no se anidaron dentro de esta DTU, por lo que designaron un nuevo genotipo al cual nombraron Tcbat o TcVII (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las divisiones de *T. cruzi*

Souto et al., 1996	Brisse et al., 2001	Zingales et al., 2009	Marcili et al., 2009
Linajes <i>T. cruzi</i> I <i>T. cruzi</i> II	Linajes <i>T. cruzi</i> I <i>T. cruzi</i> II <i>T. cruzi</i> IIa <i>T. cruzi</i> IIb <i>T. cruzi</i> IIc <i>T. cruzi</i> IId <i>T. cruzi</i> IIe	DTU <i>T. cruzi</i> I <i>T. cruzi</i> II <i>T. cruzi</i> III <i>T. cruzi</i> IV <i>T. cruzi</i> V <i>T. cruzi</i> VI	+ Tcbat o <i>T. cruzi</i> VII

2.4 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

Desde que se dieron a conocer los primeros casos de la enfermedad de Chagas, se sabe que una de las primeras señales de la picadura del triatomino es la inflamación en la zona de punción, conocida como “Chagoma de inoculación”. Esta inflamación se caracteriza como una lesión de aproximadamente 3 cm de diámetro, con un aspecto levantado, eritematosa y moderadamente dolorosa, este chagoma puede presentarse generalmente en los brazos de las personas afectadas. Cuando los tripomastigotos infectan la zona de los párpados se produce el “signo de Romaña”. El cual se caracteriza por ser un edema periorcular unilateral, de consistencia dura e indolora que puede dificultar la apertura completa del párpado y provoca secreción conjuntiva escasa (14,19) (Figura 6).



Figura 6. Manifestaciones clínicas de la etapa aguda. A) Signo de Romaña. Ojo derecho inflamado con blefaritis y dacriocistitis. El *T. cruzi* se mostró en la sangre del niño infectado de dos años. (Cortesía del Dr. Salvador Mazza, Universidad de Buenos Aires, Argentina). Tomado de Carrada-Bravo, 2004. B) Chagoma de inoculación, inflamación en brazo. Tomado de Rodríguez-Bonfante, 2003.

La fase aguda de la enfermedad puede durar de 4 a 8 semanas, y disminuir gradualmente a partir de los 90 días. En la fase aguda infantil característicamente se pueden presentar los síndromes febriles, la linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y de manera ocasional la miocarditis. La enfermedad aguda grave puede presentarse como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis. Sin embargo, estos ocurren solo en el 1-5% de los casos con un índice de mortalidad de 0.2-0.5% (20).

Después de esta etapa, los pacientes pueden pasar por un periodo de 10 a 30 años como asintomáticos, a esta fase se le conoce como forma indeterminada de la enfermedad de Chagas. No presentan reactividad serológica y las pruebas de electrocardiográficos, radiográficos de colon y esófago pudieran ser normales (14).

En la fase crónica de la enfermedad se puede presentar (en el 30% de los casos) manifestaciones como cardiomiopatías. Los daños comienzan por un bloqueo completo en la rama derecha del haz de His, se presentan extrasístoles ventriculares prematuras, bloqueos auriculoventriculares de la rama anterior izquierda, conforme avanza la enfermedad pudiera presentarse palpitaciones, dolor precordial e insuficiencia cardíaca. La cardiomiopatía crónica se caracteriza por la dilatación del ventrículo derecho, ocurre adelgazamiento irregular de las paredes ventriculares. Al microscopio se ha observado destrucción y disminución de las fibras cardíacas, así también pudiera presentarse la muerte súbita (14). En el 10% de los casos, los pacientes pudieran presentar manifestaciones en el sistema digestivo, inicialmente pudieran presentarse síntomas de disfagia, regurgitación y pérdida de peso, que infieren un problema grande pues resultan ser inespecíficos y pudiera confundirse con otras enfermedades. La etapa avanzada puede desencadenarse en mega síndromes como megaesófago y megacolon o simplemente se mantienen los problemas inespecíficos del tracto digestivo superior (20,21) (Figura 7).

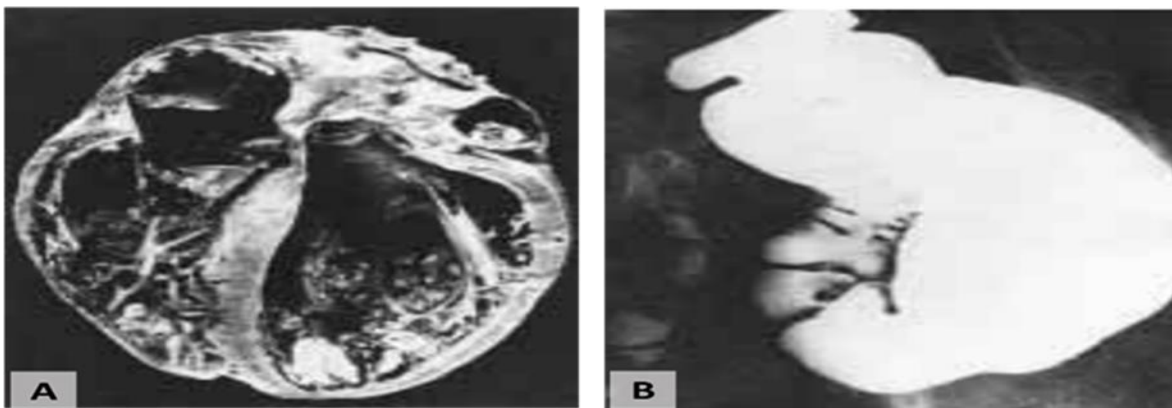


Figura 7. Manifestaciones clínicas de la etapa crónica. A) Estudio post mortem de miocarditis chagásica crónica. Dilatación y adelgazamiento de las cámaras ventriculares y trombosis intramural. (Cortesía del Dr. Fritz Köberle del Dpto. de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, Riberão Preto, Brasil. B) Estudio intestinal de bario por enema, observado en un enfermo con estreñimiento pertinaz y dilatación del abdomen. Diagnóstico: Megacolon chagásico. (Observación cortesía del Profesor J. M. de Rezende, Universidad Federal de Goias, en Brasil). Tomado de Carrada-Bravo, 2004.

2.5 Pruebas diagnósticas para la Enfermedad de Chagas

La eficacia del diagnóstico de la EC depende de la fase clínica del paciente. En su fase aguda se emplea métodos parasitológicos, que se basan precisamente en la búsqueda del *T. cruzi* en muestras de sangre, estas tienen una sensibilidad del 95% en esta fase aguda (en los primeros 7 a 15 días de la exposición al parásito) y disminuye un 50% en la fase crónica. A continuación, en la Tabla 3 se muestran las ventajas y desventajas de las técnicas parasitológicas que se emplean en este tipo de diagnóstico. (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” 2019).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las técnicas de diagnóstico parasitológicas de la EC.

Técnica	Ventajas	Desventajas
1. Frotis sanguíneo 2. Gota gruesa	1. Resultado rápido 2. Certeza diagnóstica 3. Simplicidad operativa 4. Bajo costo	Sensibilidad cercana al 60% en el periodo agudo y 10% en el periodo crónico
3. Micrométodos	1. Elevada sensibilidad 2. Certeza diagnóstica 3. obtención de muestra fácil 4. Bajo costo	Sensibilidad de 90% a 100% en el periodo agudo, no valorada en crónico
4. Hemocultivo	1. Elevada sensibilidad 2. Certeza diagnóstica 3. obtención de muestra fácil 4. bajo costo	1. sensibilidad de 90% a 100% en el periodo agudo, en crónico 20-50% 2. requiere experiencia del operador. 3. Contaminaciones por hongos y bacterias

Tomado de “Lineamientos de vigilancia por laboratorio de la enfermedad de Chagas” (InDRE), 2019.

Mientras que en fases crónicas y a partir de las 4 semanas de la exposición al *T. cruzi* se puede aplicar pruebas serológicas convencionales y no convencionales en la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. Sin embargo, diferentes estudios han observado que la aplicación de ciertas herramientas serológicas pudiera depender de la región geográfica de la población de estudio, su composición antigénica y la DTU de infección. (22,23).

Aun considerando lo anterior, recientemente se ha propuesto un enfoque serológico para la tipificación de *T. cruzi*, con base al pequeño antígeno de superficie del tripomastigote (TSSA, *por sus siglas en inglés*), con el que es posible identificar las isoformas TcI, TcII, TcIII y TcIV. También se observan algunas correlaciones entre la reactividad del TSSA con la gravedad de casos clínicos, y que se pudiera ver como biomarcador de pronóstico para la EC. Sin embargo, esta técnica aún tiene limitantes en la discriminación de infecciones entre TcV y TcVI, y requiere una identificación más precisa para la TcI (24).

En México estos dos sistemas de diagnóstico (parasitológico y serológico) se aplican bajo en siguiente algoritmo (Figura 8).

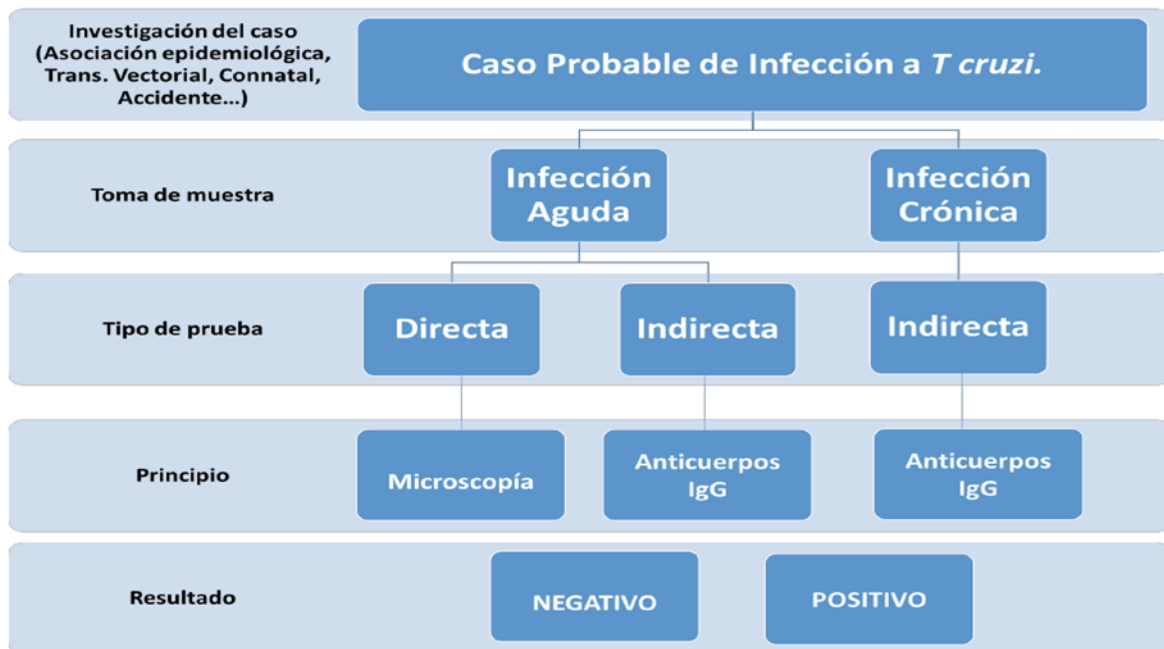


Figura 8. Algoritmo para el diagnóstico de la EC en México. Se contemplan muestras que provengan de pacientes en fase aguda y fase crónica y el tipo de prueba que mejor resultado presente. Tomado de la Secretaría de Salud, 2019.

A este algoritmo dentro del proceso de diagnóstico se agrega un flujo o guía de trabajo (Figura 9) a través de los diferentes niveles de atención, que van desde el primer nivel en los centros de salud hasta las pruebas confirmatorias que emite el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y su posterior reporte. Sin embargo, aún existen deficiencias en los tiempos de atención, particularmente al inicio del programa cuando los pacientes ingresan a través de sus centros de jurisdicción regionales.

De acuerdo a (25), la posibilidad de generar un registro nacional de pacientes con la EC ayudaría a tener una plataforma que brinde información no solo de epidemiología, si no que se podría hacer seguimiento sobre las técnicas de diagnóstico, considerando biomarcadores que cubran las necesidades de cada país. Se podría dar el seguimiento en niños, mujeres embarazadas, y donadores de sangre, sobre su tratamiento y la evaluación de la misma. Todo esto ayudaría a conseguir mejorar el trato y la calidad a los pacientes. A su vez, considera que el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) podría ser un buen candidato para manejar dicho registro.

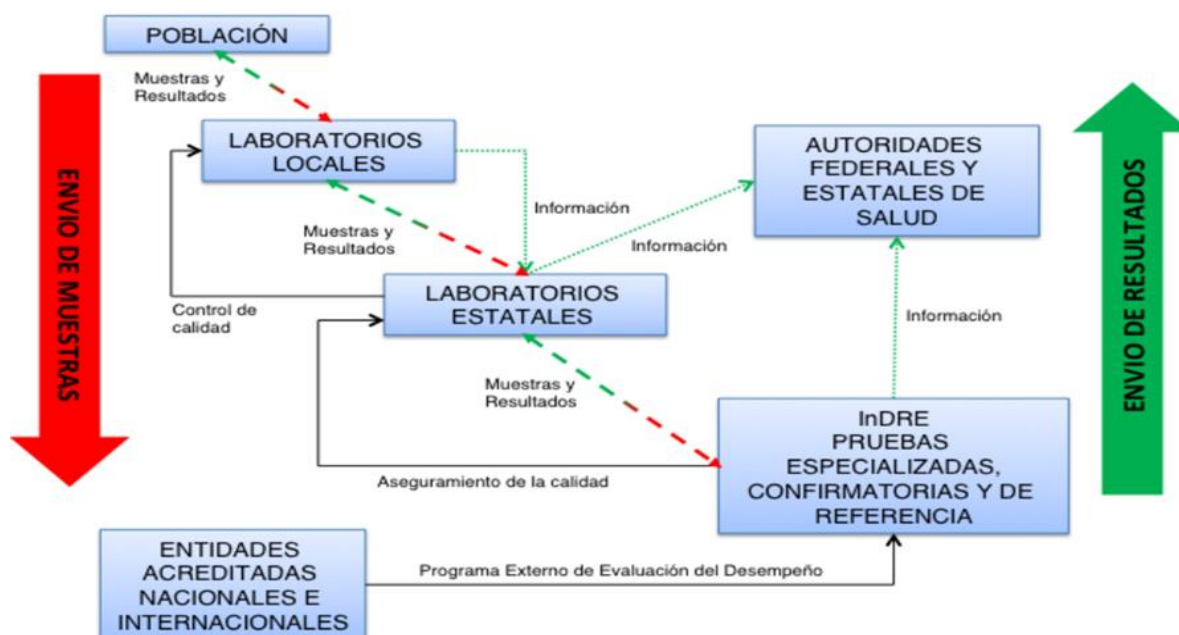


Figura 9. Proceso para el diagnóstico de la EC en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP). Las flechas en rojo, muestran el sentido en que se envían las muestras de interés. Las flechas verdes muestran el sentido en que se envían los resultados de esas muestras, así como el reporte final a las autoridades federales. Tomado de la Secretaría de Salud 2019.

Debido a la falta de resolución serológica, no se debe olvidar la implementación de pruebas moleculares en el que se considere la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR *por sus siglas en ingles*), ya que resulta de gran utilidad en aquellos pacientes que pasan las pruebas diagnósticas sin reactividad serológica o presentan pruebas no concluyentes (20).

2.6 Genes utilizados para la determinación de linajes

Desde que surge la necesidad de genotipificar y conocer las DTUs o linajes de *T. cruzi*, dentro de las infecciones, a se han explorado diferentes marcadores o genes que puedan ayudar con esta necesidad, donde se les apuesta unos más que a otros de acuerdo a la disponibilidad de la metodología dentro de los laboratorios o a la finalidad del trabajo.

Uno de los primeros genes que se han utilizado para la investigación de linajes es la región intergénica del gen miniexón y ADN ribosoma 24S α (17,26,27). A estas se han ido agregando regiones del mini círculo, gen ribosómico mitocondrial 12S, 18s, (28–30)(Figura 10), así como el gen mitocondrial de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (cox1 o COI), también se ha agregado el gen nuclear glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) que la utilizaron para evaluar la introgresión mitocondrial y observar la presencia de genotipos híbridos (31).

Todos ellos se han utilizado en cierta medida para tener un comparativo y entender que gen pudiera ser ideal para obtener resultados óptimos. Sin embargo, como se mencionó en cada artículo que utilizó estos genes, todos ellos son prometedores bajo ciertas condiciones.

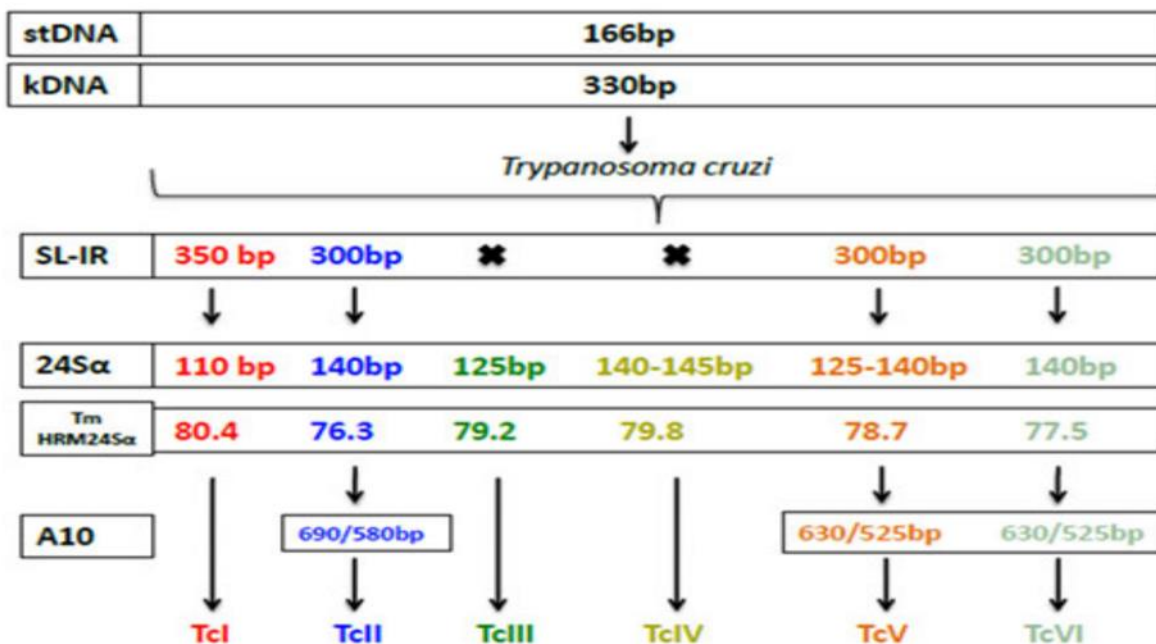


Figura 10. Genes utilizados para DTUs. Algoritmos utilizados para la tipificación de *T. cruzi*. Tomado de Jiménez *et al*, 2018.

Otro de los genes que ha sido de interés a estudiar es la proteína de choque térmico 70 (*hsp70* por sus siglas en inglés). Este está presente en la mayoría de los organismos de forma conservada. Dentro de sus características particulares, es que cuando los organismos están expuestos a diferentes tipos de estrés en la naturaleza, como por ejemplo la temperatura, las *hsp* entran en función. El estrés ocasionado por calor, puede ocasionar defectos en el citoesqueleto, fragmentación del retículo endoplásmico o del aparato de Golgi, también incurrir en la disminución de lisosomas y mitocondrias. Por ello la célula mantiene un sistema con las proteínas de choque térmico que le permita protegerse de este estrés y evitar los efectos adversos, además de estar involucrada en diferentes procesos que ayudan a la homeóstasis de la célula y por supuesto incluyendo degradación y síntesis de proteínas (32,33).

2.7 Proteína de Choque Térmico 70kDa (*hsp70*)

La mayoría de las familias de *hsp* tienen funciones de chaperonas moleculares, entre las más conocidas están la *hsp104*, *hsp90*, *hsp60*, *hsp70* y las pequeñas *hsp* (32).

Particularmente sobre la *hsp70* de *T. cruzi* se sabe que sufre de choque térmico cuando el parásito se prepara para pasar de un vector a un mamífero en la infección, así mismos estudios han comprobado que al aumentar las temperaturas los niveles de *hsp70* aumenta cuando está en etapas de epimastigotes. Y otros más han comprobado que la *hsp70* citosólica y mitocondrial es 100 veces más activa en *T. cruzi* que en humanos. Por esto mismo se ha demostrado que *T. cruzi* tiene un alto grado de supervivencia, diferenciación y virulencia intracelular (33).

Este gen también ha sido utilizado de forma parcial para hacer un diagnóstico diferencial entre *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante ensayos de PCR que discrimina la especie mediante análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) así como una PCR dúplex en la cual se obtienen dos fragmentos de diferente tamaño para observar estas dos especies, lo cual es de suma relevancia al considerar que *T. rangeli* es no patógeno para el humano (34).

También se ha explorado para la construcción de relaciones filogenéticas entre diferentes especies de *Trypanosoma*, cuyos resultados demuestran que es un marcador molecular prometedor que tiene la capacidad de hacer una discriminación entre cada especie (35).

Este gen también se ha implementado en la construcción de filogenias de *Leishmania* (36), así como pruebas de diferenciación entre especies de importancia clínica, en la identificación de *Leishmaniasis* a partir de casos clínicos (37–39), todos ellos con resultados certeros para aplicarse en el diagnóstico, estudios terapéuticos y estudios epidemiológicos, porque de manera general ha mostrado ser un gen adecuado para su análisis por su grado de conservación a nivel de especie, intraespecie y supraespecie (36).

2.8 Unidades Discretas de Tipificación (DTU)

Las DTUs muestran ser unidades fiables para los análisis de epidemiología molecular y estudios experimentales de evolución, así como la filogeografía (Zingales *et al.*, 2012). Mismos que han sido mejor estudiadas y analizadas en Sudamérica dentro de los ciclos selváticos y domésticos (Figura 11).

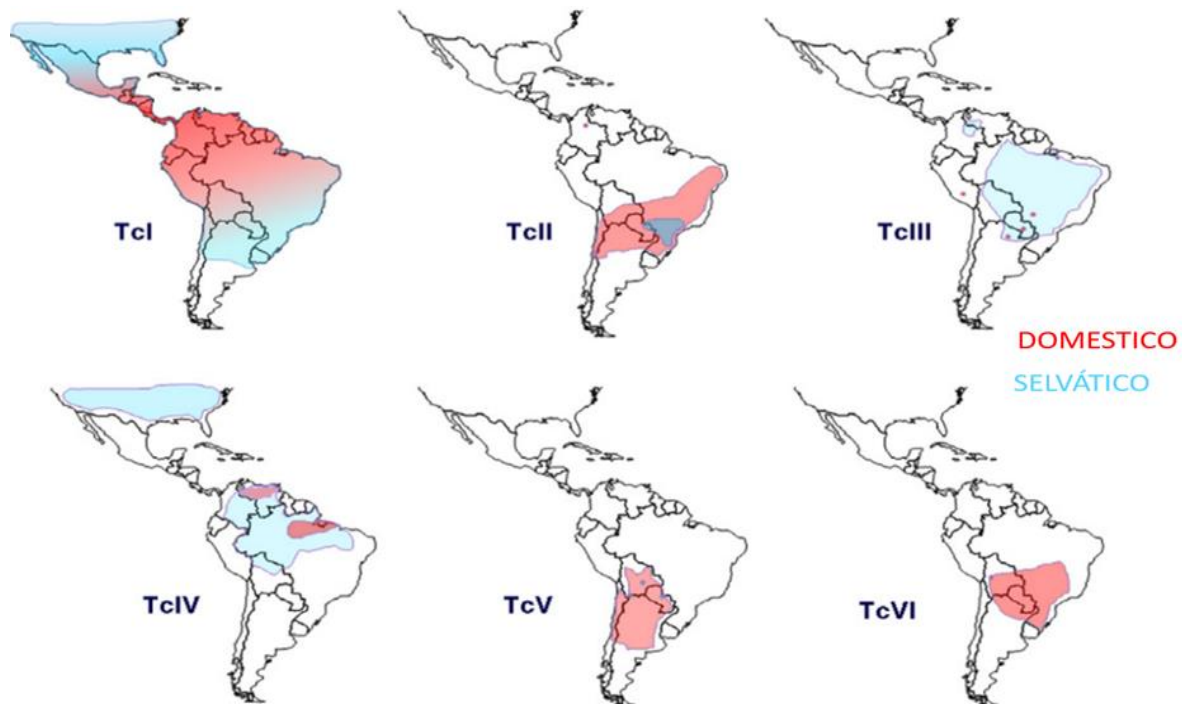


Figura 11. Distribución geográfica de DTUs *T. cruzi* asociada a ciclos de transmisión. En los ciclos selváticos y domésticos de cada región de Latinoamérica. Tomado de Zingales *et al.*, 2012.

(40) amplían el registro de la distribución geográfica de *T. cruzi* en diferentes biomas del sur de Brasil reportando TcII y genotipos híbridos de TcV/TcVI, ellos creen que no existe una barrera biológica o ecológica para el establecimiento de cualquier DTU en todo el país. Esta idea la confirma (31), donde utilizan dos tipos de genes (cox1 y GPI) para la discriminación de estas DTUs en donde finalmente puede observar Tcbat, TcI, TcII, TcIII y TcIV.

Por otro lado, (35) analizando la filogenia de *T. cruzi* mediante el gen *hsp70* identificaron tres grupos de *T. cruzi* (TcI, TcIII y TcII + V + VI), además de ver al *hsp70* como un marcador de diagnóstico prometedor al discriminar la mayoría de las especies y clados de *Trypanosoma* que utilizaron.

Fuera de América Latina, España es el país europeo con más número de casos de la EC, en 2017 identificaron DTUs de *T. cruzi* provenientes de migrantes bolivianos, utilizando dos diagramas de flujo de PCRs ellos encontraron los DTU tipo I (TcI/III), tipo II (TcII/IV) y tipo I/II híbrido (TcV/VI), así mismo infecciones mixtas TcV más TcII y TcV más TcII / VI, y por método de secuenciación de SatDNA encontraron el tipo I/II. En este análisis observaron que el TcV fue el más común (5).

2.9 Unidades Discretas de Tipificación (DTU) en México

En México, los reportes de DTUs que se han hecho son los descritos por (28), en el centro de Veracruz utilizando el vector principal (*Triatoma dimidiata*). Los resultados fueron que inesperadamente TcI solo representó 9/33 cepas identificadas (27%), y reportan por primera vez la presencia de cepas de TcII, TcIII, TcIV y TcV.

En Michoacán hacen el reporte de los linajes TcI, TcII además de TcIII Y TcIV en triatominos capturados dentro de viviendas (29).

En el Estado de Morelos, (41), hacen uno de los primeros reportes en triatominos, se encontraron infecciones con TcI y TcII. Más tarde (42), en muestras de donadores de sangre seronegativos reporta la presencia de TcI y TcII e infecciones mixtas.

En el Estado de Yucatán reportan la presencia de DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI en pacientes Chagásicos (serológicamente confirmados), así mismo expresa la posible infección al suroeste de México con múltiples DTUs de *T. cruzi* (43).

Aunque por mucho tiempo se consideró que en México solo estaba presente la DTU I y II los nuevos reportes muestran que también existen una amplia distribución de estas diferentes DTUs. Así mismo al sur de Texas se ha hecho el reporte de EC autóctono (44) y también se han hecho reportes en Nuevo Orleans de DTUs TcI, TcV y TcII en ratones infectados de forma natural (45), por lo que sin duda alguna la distribución de la EC sigue siendo compleja.

Otro de los aspectos importantes sobre el conocimiento de la distribución geográfica de estas DTUs es comprender la relación con el tropismo tisular que presenta la enfermedad, ya sea al sistema cardíaco y/o digestivo.

Existe un modelo al que llaman “el modelo clonal histotrópico de la Enfermedad de Chagas” donde la "constelación" específica de clones infectantes y sus tropismos específicos están involucrados en diferentes manifestaciones de la enfermedad (46).

En el 2013 (27), hacen una búsqueda sobre las manifestaciones clínicas de la EC en sus diferentes etapas (aguda, crónica) con las DTUs de *T. cruzi* para entender el significado clínico de las subdivisiones biológicas de *T. cruzi* (Tabla 4). En este análisis obtuvieron resultados de la existencia de diferentes DTUs en pacientes con manifestaciones clínicas similares, así como la existencia de pacientes con distinto tipo de manifestación infectados por la misma DTU. Lo que infieren que es de importancia la relación hospedero-parásito para determinar la evolución de la EC.

Tabla 4. Asociación de DTUs *T. cruzi* y Ecotopos, Huéspedes y Patologías (Cura & Schijman, 2013).

Genotipo	Ecotopo/nicho	Geografía	Enfermedad de Chagas
TcI	Primario: arboreo palmeras (Attalea), hechos en árboles. Secundario: árido, rocoso terrestre en Amazonia	Amazonia, región andina central, América Central y México	Norte de las amazonas, brotes orales esporádico en el Cono Sur (región del Gran Chaco)
TcII	No se conoce completamente, raro en ciclos silvestres	Cono Sur (predomina en Brasil) esporádico en el Norte	Brasil Atlántico y Central. Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos
TcIII	Terrestre, fosorial	América del Sur	Raro en humanos (también en perros domésticos). Casos agudos en la Amazonia brasilera. Presentación clínica desconocida
TcIV	Arbóreo, y algunos hospederos terrestres en Norteamérica	América del Sur y del Norte	Causa secundaria de enfermedad de Chagas en Venezuela, esporádico en el resto de América del Sur
TcV	Raro en ciclos silvestres	Cono Sur, Gran Chaco, extremo sur de Brasil	Cono Sur Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos. Transmisión vectorial y congénita
TcVI	Raro en ciclos silvestres	Cono Sur, Gran Chaco	Cono sur. Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos

también en una revisión sistemática sobre las manifestaciones clínicas asociadas a la Cardiomiopatía Chagásica Crónica, considerando los principales factores de la EC; la variabilidad genética del parásito, la genética del huésped y su respuesta inmune (30) (Figura 12).

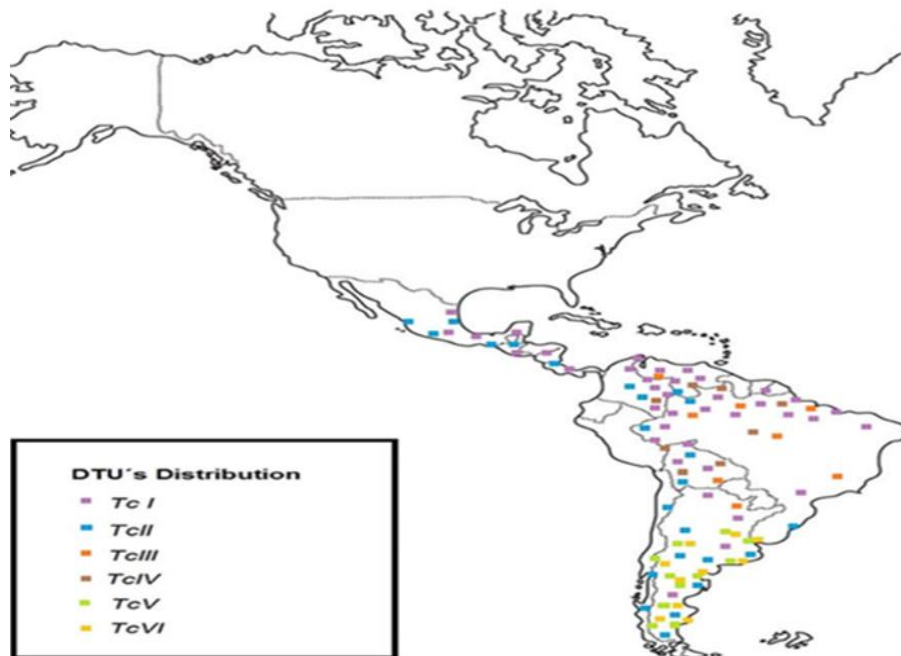


Figura 12. Distribución geográfica de DTU *T. cruzi* asociada a cardiomiopatía. Cada color indica una DTU diferente. (Jiménez *et al.*, 2018).

Aunado a esto también es importante considerar las variantes intra DTU I que se pudieran presentar en una infección, pues agranda la complejidad en la infección.

2.10 Haplotipos

Durante mucho tiempo se consideró que la DTU I era un grupo conservado. Sin embargo, después de años de corroborar esta homogeneidad en TcI, distintos trabajos han demostrado que presentan una variabilidad genética intra clado (47–50).

Estos trabajos establecieron cuatro genotipos denominados haplotipos los cuales fueron relacionados con los ciclos de transmisión de la EC. Los haplotipos se describieron de la siguiente manera:

Ia: haplotipo asociado con la infección humana y los vectores domésticos (relacionado con *Rhodnius prolixus*), está presente en un patrón específico en las posiciones 28 con una adenina y un motivo TGTGTG en las posiciones 35-40 (47,49).

Ib: haplotipo asociado con la infección humana y los vectores peridomiciliares (relación con *Triatoma dimidiata*), contiene una sustitución T-C en la posición 44.

Ic: haplotipo está asociado con aislamientos peridomésticos se caracteriza por una secuencia TATATA en la posición 35-40.

Id: haplotipo que se asocia con el ciclo selvático se caracteriza por una delección de nueve nucleótidos en las posiciones 15-23 de la región de microsatélites del gen del miniexón.

La evidencia de diferentes marcadores genéticos indica que existe una variación genética a nivel de intra-DTU. Entre los DTUs, el DTU I es el linaje que mayor heterogeneidad genética como posible consecuencia de sus características epidemiológicas (22).

3. ANTECEDENTES

3.1 Variación intra específica de *Trypanosoma cruzi* I

Uno de los primeros trabajos en dilucidar la variabilidad dentro del grupo TcI fue (47)(, donde analizan 12 cepas aisladas de *T. cruzi* de diferentes hospedadores colombianos (en el que se incluía 1 de *Didelphis marsupialis*, 4 de *Rhodnius prolixus*, 3 de *Triatoma dimidiata*, 1 de

Triatoma venosa y 3 de humanos) a través de un diseño de PCR multiplex para amplificar la región intergénica del gen miniexón, seguido del proceso de secuenciación de sus productos. El resultado de los análisis arroja cuatro grupos o haplotipos. Situados en una región microsatélite de 56 nucleótidos (nt) donde se observó que en las posiciones 15–40 hay mayor variabilidad entre los cuatro haplotipos propuestos. Estos haplotipos fueron relacionados de acuerdo al ciclo de transmisión de donde provenían los aislados y así inicio la relación con el ciclo de transmisión en donde el 1 y 3 se asociaron con ciclos de transmisión doméstica mientras que 2 y 4 presentaron mayor similitud con ciclos de transmisión salvajes. Figura 13

1	CGC	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
	TVC	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
	SN6C	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	59
2	FChC	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	Td11C	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	JLC	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	Mg10C	TCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
3	X380C	TCCTGCAGGCACAC	-GCACACGTTGTGTGTGTGTATATATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	59
	EFC	TCCTGCAGGCACAC	-GCACACGTTGTGTGTGTATATATATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	60
4	Dm28 eo1C	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	Dm7C	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	FALC	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	JD18	TCCTGCAGGCACAC	-----GTGTGTGTGTGTATGTATGCT	CCACCCACCTCCGGCT	51
	X00632	-CCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGTGCC	CCACCCACCTCCGGCT	58
	AY367129	-CCCTGCAGGCACAC	-GTGTGTGTATGTATGTATGTG-----	CCACCCACCTCCGGCT	52

Figura 13. Región de microsatélites 1. Con un promedio de 56 nt, donde se puede observar claramente la variabilidad entre los cuatro haplotipos propuestos. Alineación de *T. cruzi* cepas gen del miniexón. * No se observan diferencias en la alineación. El área encuadrada corresponde a los polimorfismos de nucleótidos (SNP) que se encuentran entre los cuatro haplotipos propuestos. También se muestran las secuencias de la región de microsatélites de X00632 y AY367129, informadas por GenBank en los aislados de GenBank de Brasil. Tomado de Herrera, C. *et al.*, 2007.

Con el objetivo de corroborar la existencia de los haplotipos dentro de *T. cruzi* I basados en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) utilizando la región intergénica del gen miniexón nuevamente (48) utilizan 31 aislados de *T. cruzi* para observar este fenómeno. Los resultados de la alineación de las secuencias correspondientes a TcI, mostró agrupaciones en cuatro grupos de haplotipos basado en los sitios polimórficos en la región inicial compuesta por 56

nucleótidos (nt), esta región microsatélite presentaba (TG)_n (TATG)_m (TG)_x. El número de las repeticiones variaron entre 4 y 7 (n), 2 y 4 (m) y 0 y 3 (x) (posiciones 15 a 40) el haplotipo Ia se asocia principalmente con el ciclo doméstico y domiciliado *Rhodnius prolixus*. El haplotipo Ib está asociado con ciclo doméstico y ciclo peridoméstico, el haplotipo Ic está estrechamente relacionado con el ciclo peridoméstico, y el haplotipo Id está fuertemente asociado con el ciclo selvático (Figura 14).

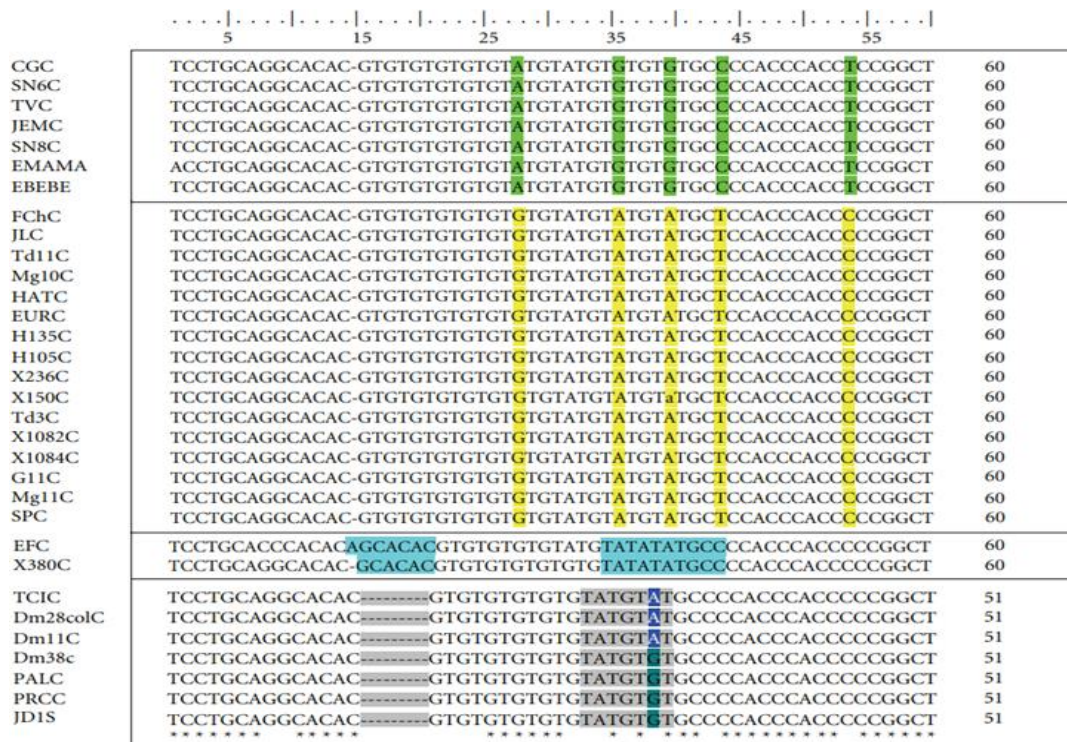


Figura 14. Región de microsatélites 2. Con una media de 56 nucleótidos en la que se puede observar claramente la variabilidad entre los 4 haplotipos propuestos. Alineación del gen miniexón de cepas de *T. cruzi*. * No se observan diferencias en la alineación. El área encuadrada corresponde a los polimorfismos de nucleótido único (SNP) encontrados entre los cuatro haplotipos propuestos. (Herrera, C. *et al.*, 2009).

El árbol obtenido por máxima verosimilitud mostró claramente los cuatro haplotipos bien sustentados dentro de los aislados de *T. cruzi* I y sus relaciones con el ciclo de transmisión doméstico, ciclo doméstico/peridoméstico, ciclo peridoméstico y ciclo selvático (Figura 15).

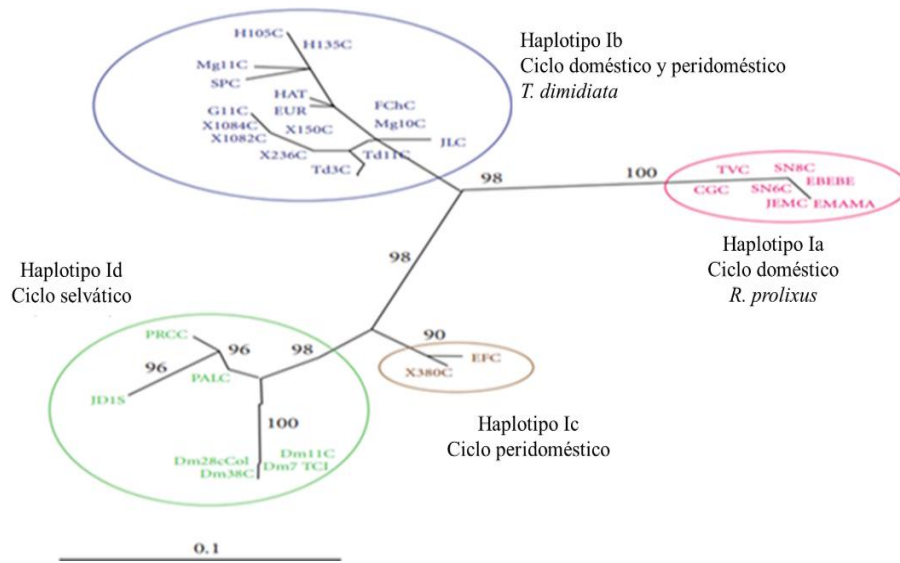


Figura 15. Árbol filogenético sin raíces de *T. cruzi*. Representa las relaciones evolutivas entre los aislados de *T. cruzi* I, el árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud. Los números en fuentes más grandes representan los valores de arranque para el grupo principal de haplotipos. La topología obtenida para este método representa el consenso de 236 árboles (100 réplicas cada uno produciendo, en promedio, 4 árboles más parsimoniosos), Bootstrap consenso de la regla de la mayoría del 50%. (Herrera, C. *et al.*, 2009).

El grupo de (49). Tomando 37 aislados colombianos de varios reservorios, hacen el reporte de los haplotipos Ia, Ib e Id. También observan que hay un grado de conservación a lo largo de la alineación, sin embargo, hubo regiones polimórficas correspondientes a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y deleciones que caracterizan a cada haplotipo. Por ejemplo, los aislados incluidos en el haplotipo Ia presentó SNP en las posiciones 28 y 35-40 (Figura 16). La importancia de genotipificar las poblaciones de parásitos y establecer una asociación con ciclos humanos ayudará a diseñar nuevos tratamientos farmacéuticos de acuerdo con los antecedentes genéticos y fenotípicos del parásito.

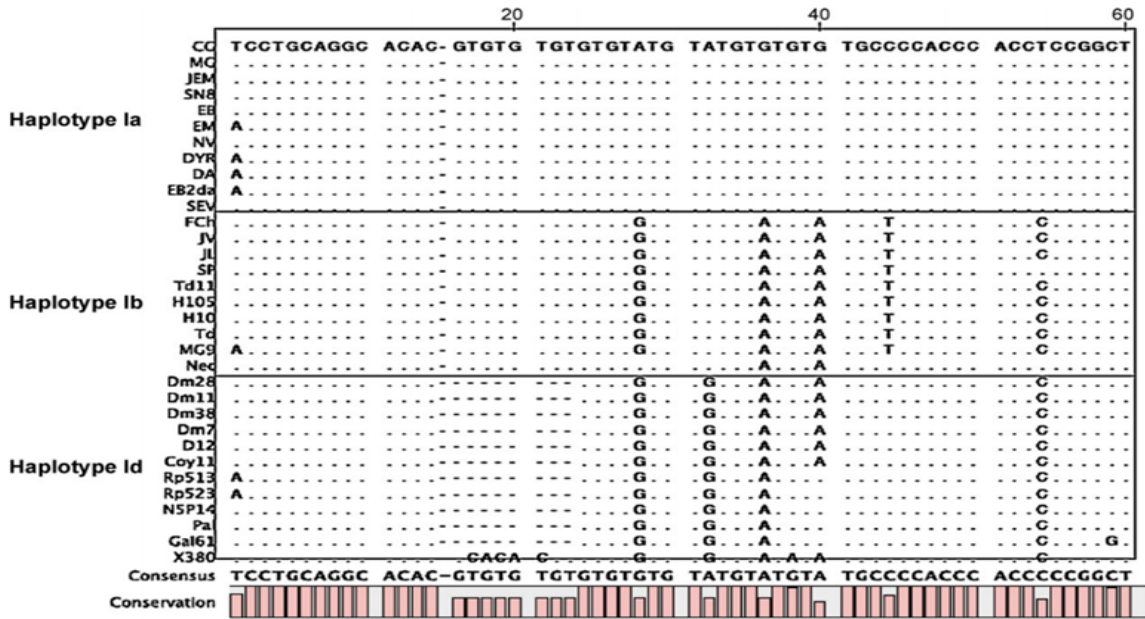


Figura 16. Sitios polimórficos. Muestran en una alineación múltiple de la región de microsatélites de 60 nucleótidos correspondiente a la región intergénica del gen miniexón. (Falla *et al.*, 2009).

Ante los reportes hechos sobre la posible variación dentro del linaje TcI, (51), cuestiona la posible necesidad de realizar una nueva subdivisión genética para *T. cruzi*. En su texto destaca que, aunque son amplios los trabajos exhibiendo esta variación, se requiere de análisis más robustos para poder proponer una nueva clasificación.

(50) cuestionan la propuesta de haplotipos utilizando solo una región no codificante como lo es el gen mini exón, SL-IR, marcadores microsatélites, kDNA cariotipo de minicírculo y espaciadores transcritos internos además de utilizar un numero restringido de aislados, ya que posiblemente estos análisis se han basado en una variación neutra.

Por lo tanto, ellos proponen un análisis PCR-RFLP multilocus utilizando las regiones codificantes de un conjunto de clones de TcI que fueron aislados de humanos, insectos vectores y reservorios de diferentes regiones geográficas de Colombia. Seleccionaron 70 clones y utilizaron 9 blancos de la región codificante y 1 no codificante para el análisis, los loci seleccionados fueron; la glicoproteína de 72 kDa (Gp72), Histona 1 (H1), proteína de unión al calcio (1f8), proteína de choque térmico 60 (*hsp60*), la glicoproteína de 63 kDa.

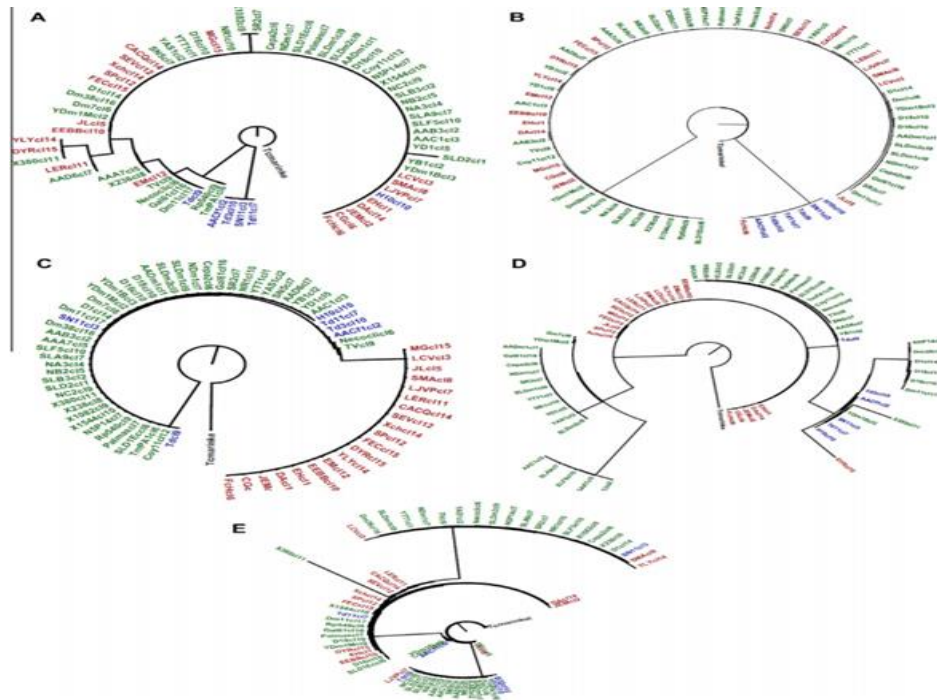


Figura 17. Filogramas obtenidas según las distancias genéticas. Calculadas en base a los objetivos polimórficos (Rojo: clones domésticos, Azul: clones peridomésticos, verde: clones selváticos, Negro: *T.c. marinkellei* como grupo externo). (A) 1f8; (B) HSP60; (C) SAPA; (D) HSP70; (E) H1. Todos los cladogramas mostraron valores de bootstrap superiores al 75%. (Ramírez *et al.*, 2012).

Así mismo el árbol consenso presento un filograma en el que era visible dividir dos grupos correlacionada con el ciclo de transmisión (Figura 18).

El grupo 1 contiene clones aislados de los reservorios selváticos y los triatominos, que se agruparon con un aislado ancestral. El grupo 2 contiene clones aislados de insectos domésticos, vectores, reservorios peridomésticos e infecciones humanas.

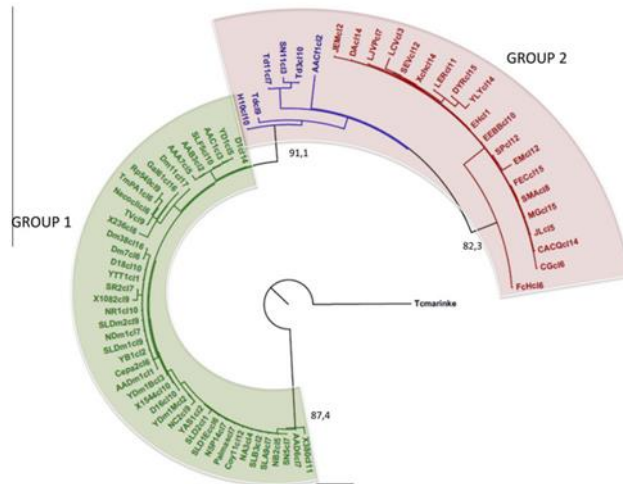


Figura 18. Árbol consenso. Construido utilizando los cinco objetivos polimórficos basados en la estrategia multilocus PCR-RFLPs. El filograma permite observar dos bien definidos grupos asociados a los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia (rojo = clones domésticos, azul = clones peridomésticos, verde = clones selváticos, negro = *T.c. marinkellei* como grupo externo). Tomado de Ramírez *et al.*, 2012.

En México uno de los reportes de haplotipo es el descrito por (52). En este análisis también utilizaron la región intergénica del miniexón en un conjunto de cinco aislados de *T. cruzi* provenientes del vector principal (*T. dimidiata*) capturados dentro de viviendas en la península de Yucatán y dos cepas mexicanas adicionales no relacionadas geográficamente (cepa 1; de un humano agudo caso en el estado de Oaxaca (cepa Ninoa) y cepa 2; de *Meccus picturatus* en el estado de Nayarit). Los resultados indican que el haplotipo Ia está presente en *T. dimidiata* en la península de Yucatán y además circula en las regiones noroeste y suroeste de México y vectores como "Cepa Nay" en *M. picturatus*.

Aunque se reporta la presencia de Tc Ia en la Península de Yucatán, *T. dimidiata* es más bien un vector visitante que un domiciliado participando más en ciclos peridomésticos y selváticos. El humano sería un huésped accidental en este ciclo. Así, Tc Ia se está introduciendo en el ser humano a través de vectores peridoméstico y selváticos.

En el estado de Morelos, nuestro grupo de investigación ha logrado la estandarización de pruebas de PCR para la identificación a *T. cruzi* (53,54). Bajo este mismo esquema experimental de PCR punto final TcS35/36 Monroy (55) pudo realizar el diagnóstico molecular para la detección de *T. cruzi* en muestras de ex donadores de sangre seronegativos en el estado de Morelos. En 2016 Garduño (42) hace la identificación de linajes de *T. cruzi* en donadores de sangre del estado de Morelos a través de PCRs anidados. Y en 2018 Bastidas-Leal (56) realiza la confirmación de la infección específica a *T. cruzi* descartando la presencia de *T. rangeli* en muestras clínicas provenientes de ex donadores de sangre humana y voluntarios con antecedente de punción al triatomino utilizando PCR dúplex y una región de gen *hsp70* bajo el concepto de Fraga 2014. En 2021 Gutiérrez-Reyna (57) completa el análisis realizando la identificación de DTUs en muestras de Morelos y el centro de país a través de PCR-RFLPs utilizando las condiciones de Fraga 2014.

Los reportes sobre la presencia de haplotipos dentro de la DTU I, la cual es considerada de mayor frecuencia en el país, abren la oportunidad de verificar la existencia de estos haplotipos haciendo el seguimiento en nuestras muestras analizadas.

Cuando se realizó el diseño experimental utilizando un fragmento del gen *hsp70*, faltó concluir con la verificación de una secuenciación a las muestras positivas para tener una cuarta confirmación sobre que la región amplificada se trata de *T. cruzi*. Esto también brinda la oportunidad de poder hacer un análisis filogenético y verificar los resultados.

4. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública para México y América Latina, sigue considerándose una enfermedad desatendida pues realmente no se le ha prestado la suficiente atención, ni la suficiente inversión para controlarla (58). La complejidad de esta infección radica entre los distintos ciclos de transmisión y el gran número de vectores y reservorios que existen en cada país de América Latina. A esto se le suma la gran variabilidad genética que presenta el *Trypanosoma cruzi*. (17,18). Los reportes de DTUs está mejor estudiada y representada al sur de América, así como el reporte de variabilidad intra-linaje que existe entre ellos. En México aún son pocos los reportes de DTUs al igual que los reportes de variantes intra-linaje, pues solo contamos con registros de la zona suroeste del país. Por lo que hacer el análisis de las variantes genéticas en TcI considerada la más frecuente en México utilizando aislados humanos a través del gen *hsp70* considera como un marcador prometedor como lo ha reportado Ramírez y colaboradores en el 2012 aportaría al conocimiento para entender la dinámica de transmisión en las personas que han sido PCR positivas confirmadas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la variabilidad genética en las Unidades Discretas de Tipificación (DTU I) en el gen *hsp70* de *Trypanosoma cruzi*, de muestras de residentes del Estado de Morelos?

6. HIPÓTESIS

Existe variabilidad genética en las Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) en el gen *hsp70* de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar, mediante secuenciación y análisis bioinformático, la variabilidad genética de las Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) del gen *hsp70* de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Diseño del estudio

El presente estudio es observacional, descriptivo y transversal ya que el fenómeno estudiado se evaluó y midió una sola vez. Se empleó estadística descriptiva para dar cuenta de los hallazgos y no se realizó ningún tipo de intervención en el proceso salud enfermedad.

8.2 Sedes del estudio

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (LMTE-FM-UAEM), el laboratorio perteneciente al área de infección e inmunidad del centro de investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” de la Habana Cuba.

8.3 Criterios de selección

En el presente estudio se utilizaron los siguientes criterios de selección: Muestras de sangre de voluntarios con antecedente de punción al triatomino o sospecha de picadura y de donadores de sangre que no pasaron el filtro de serología para *T. cruzi* que fueran residentes del Estado de Morelos.

8.3.1 Criterios de inclusión

Para la secuenciación se utilizaron únicamente muestras con criterios aceptables pureza, integridad y control interno de amplificación (arriba de 1.8, observa una sola banda en un gel de agarosa al 1.5% y amplificación de GPDH por reacción en cadena a la polimerasa (PCR), respectivamente. Además, se determinó que dichas muestras además fueron positivas a la infección con *trypansomoma* mediante la prueba de PCR Tc35 y 36, con diagnóstico negativo a *T. rangeli* mediante la prueba de PCR dúplex. Los resultados de ambas pruebas confirman la infección con *T. cruzi*. No se realizó distinción por edad, sexo o patologías preexistentes.

8.3.2 Criterios de no inclusión

Se excluyeron del presente estudio las muestras que mostraron resultados indeterminado en la prueba de PCR Tc35 y 36 (dos resultados negativos y uno positivo). También aquellas que obtuvieron una Unidad Discreta de Tipificación (DTU, *por su sigla en inglés*) diferente a TcI.

8.3.3 Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio aquellas muestras de las que no se obtuvieron resultados después de la secuenciación.

8.4 Obtención de muestras

Se analizaron 183 muestras provenientes de la Bio-colección del LMTE-FM-UAEM que está integrada por alícuotas de suero, plasma y buffy coat con un volumen aproximado de 1 mL. Estas muestras fueron colectadas de participantes voluntarios con antecedente de punción por triatomino que residen en distintos municipios del Estado de Morelos y de ex donadores de sangre humana con y sin reactividad serológica a *T. cruzi*. Estas muestras provienen a partir del proyecto “PCR dúplex para la confirmación de la infección por *Trypanosoma cruzi* mediante el gen *hsp70*” (56). Y del proyecto de “Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU’s) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos” (57).

8.5 Selección de muestras

A partir de la Bio-colección del LMTE-FM-UAEM se analizaron 183 muestras. En primer lugar, las muestras de suero de todos los participantes se les realizó un análisis serológico consistentes en dos pruebas que se realizan de rutina para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La primera fue la prueba de hemoaglutinación indirecta (HAI) y la segunda una prueba ELISA para detectar *T. cruzi*. Se obtuvo el ADN con el método fenol-cloroformo y método de columna a partir de la muestra de buffy coat. El ADN obtenido se le realizó el diagnóstico mediante la prueba de PCR utilizando los oligos TcS35/36. Estos permiten la amplificación de una región del kinetoplasto. A las muestras PCR TcS35/36 positivas se les realizó la prueba de PCR Dúplex que detecta tanto a *T. cruzi*, como *T. rangeli* (*TcTr*). Para

esta prueba se utilizaron los oligos F1048, R1142Tc, R1249Tr que amplifican un fragmento del gen de la proteína *hsp70*. Y permite la confirmación de la infección por *T. cruzi*. Finalmente, para determinar que muestras eran DTU I positivas se realizó una prueba de PCR en la cual se amplificó un fragmento del gen *hsp70* de 545 pb utilizando los oligos HSP70_DTUF, HSP70_DTUR. Después, el producto de PCR se dividió en dos fracciones. Una fracción se utilizó para determinar la DTU y la segunda se utilizó para la secuenciación. Para determinar la DTU I a la primera fracción se le realizó una digestión enzimática con las enzimas AgeI/HinfI siguiendo la metodología reportada por Fraga, 2018. Después de la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras DTU I positivas fueron aquellas que mostraron dos bandas en el gel de agarosa, una a 303 pb y otra a 242 pb. Después de realizar todas estas pruebas de las 183 pruebas analizadas se obtuvieron 26 muestras DTU I positivas. Estas muestras fueron las que se purificaron y fueron secuenciadas para el posterior análisis bioinformático.

8.6 Purificación de productos de PCR *hsp70*

La purificación de los productos de PCR *hsp70* se realizó utilizando el kit *MiniElute™ Purification (Qiagen, EUA)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 1 volumen de la muestra de PCR se le agregaron 5 volúmenes de Buffer PB y se mezcló en un agitador vórtex, poniendo atención al color de la reacción. Un color amarillo en la reacción indicara un pH óptimo para la unión de ADN. Sin embargo, un color naranja o violeta indica lo contrario. Si lo segundo fue el caso, se agregaron 10 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.0) y se mezcló en el vórtex, hasta que el color se tornará amarillo. Después, todo el volumen de la mezcla se transfirió a una columna de purificación, QIAquick, se centrifugó por 1 minuto a 12,000 g. y se desechó el filtrado. Posteriormente, a la columna de purificación se le agregaron 0.75 ml de Buffer PB y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 g. Nuevamente se descartando el filtrado y se colocó la columna de purificación en el tubo recolector. Se centrifugó nuevamente la columna de purificación por un minuto para remover cualquier residuo de buffer de lavado. Enseguida, la columna de purificación se transfirió a un tubo limpio de 2 ml y se le agregaron 50 µl de Buffer EB (Tris·Cl, 10 mM, pH 8.5), seguido de centrifugación por 1 minuto a 12,000 g. Terminada la centrifugación se desechó la columna de purificación y se el producto de PCR purificado contenido en el tubo se almacena a -20°.

8.7 Secuenciación del producto de PCR *hsp70*

Se realizó la secuenciación de los productos de amplificación de la PCR-DTU *hsp70* obtenidos de 26 muestras de pacientes que resultaron DTU I, con el objetivo de conocer la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para la proteína *hsp70* de este linaje. La secuenciación se realizó de forma automática utilizando el secuenciador automático ABI3730 (*Applied Biosystems*) y el kit Big Dye terminator cycle-sequencing ready reaction (*Applied Biosystems, Foster, California. EUA*). Durante este proceso, se secuenciaron ambas cadenas de los amplicones generados, utilizando los cebadores HSP70_DTUF y HSP70_DTUR, excepto de los nucleótidos contenidos en los extremos correspondientes a la región complementaria a los cebadores de los que se secuenció una cadena solamente. Se obtuvo la secuencia consenso de cada amplicón estudiado (de ambas cadenas) utilizando el programa Clustal X con ajuste manual (Thompson *et al.*, 1997). Las secuencias obtenidas se reportaron en la base de datos del Gene Bank en donde se les asignó un número de acceso.

8.8 Alineamiento de secuencias

Todas las secuencias correspondientes a los productos *hsp70* amplificadas fueron alineadas. El alineamiento se realizó utilizando el programa Unipro UGene: a unified bioinformatics toolkit" Okonechnikov; Golosova; Fursov; the UGENE team Bioinformatics 2012 28: 1166-1167 (<http://ugene.net/download.html>). Bajo el criterio de alineamiento con MUSCLE. Este alineamiento permitió caracterizar algunos elementos de las secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la proteína *hsp70* entre los aislamientos de pacientes, y sirvió de marco de referencia para los estudios filogenéticos.

Como controles se alinearon también otras secuencias de *T. cruzi* DTU I y una representación de cada uno de los linajes de *T. cruzi* previamente publicadas en el GeneBank para un total de 18 secuencias. También se realizó el alineamiento de una secuencia de *T. cruzi marinkellei* y una de *T. rangeli*, así como una secuencia de *L. donovani* y *L. braziliensis*, estos últimos que se utilizarán como grupo externo (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias del gen *hsp70* citoplasmático de *T. cruzi*, *T. cruzi marikellei*, *T. rangeli*, *L. donovani* y *L. braziliensis* utilizadas en el análisis filogenético

Especie	Nombre del aislamiento	País	Genotipo ^a	Número de acceso
<i>Trypanosoma cruzi</i> (n=16)	SP104	Chile	I	KC959988
	OPS21	Venezuela	I	KC959989
	MAS	Brazil	II	KC959990
	Esm	Brazil	II	KC959991
	PERU	Peru	II	M26595
	M5631	Brazil	III	KC959992
	M6241	Brazil	III	KC959993
	CM17	Colombia	III	KC959994
	92122102R	USA	IV	KC959995
	CanIII	Brazil	IV	KC959996
	SO3	Bolivia	V	KC959997
	MN	Chile	V	KC959998
	CL Brener	Brazil	VI	KC959999/XM_812644/ XM_812645
	P63	Paraguay	VI	KC960000
	Y	Brazil	nk	FJ222459
BRAZIL	Brazil	nk	X67716	
<i>Trypanosoma rangeli</i> (n=1)	B28V1A06P2C3	Venezuela	nk	KC960005
<i>Trypanosoma cruzi marikellei</i> (n=1)	M1909	Venezuela	nk	KC960011
<i>L. donovani</i>	1S	Sudan	ns	FN395027
<i>L. braziliensis</i>	CUM180	Bolivia	ns	FN395039

8.9 Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas entre las distintas muestras estudiadas se analizaron con base a la información obtenida de las secuencias del gen *hsp70*, en comparación con dos cepas de *Leishmania spp* que se utilizaron como grupos externos. El análisis se realizó en la plataforma de CIPRES Miller, MA, Pfeiffer, W. y Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic árboles" en Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 de noviembre de 2010, New Orleans, LA, págs. 1-8. (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>).

La construcción de los árboles se basó en parámetros de caracteres; Máxima Verosimilitud “*Maximun Likelihood*”, bajo el modelo “Felsenstein 1981 (F81)” y proporción de sitios invariantes. El soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método de Bootstrap (*en inglés*), utilizando 10000 réplicas y pruebas de Inferencia Bayesiana, en el que se

consideraron particiones por codón, y se indicaron 1000000 generaciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC). Con una frecuencia de muestreo de 1000, y un total de 8 cadenas, todo esto utilizando el mismo modelo evolutivo que arrojó la prueba de máxima verosimilitud. La visualización de los árboles consenso se hizo en FigTree v1.4.4 y se editaron utilizando Inkscape v1.2.0.

9. RESULTADOS

9.1 Descripción de la población de estudio

Nuestra población de estudio consto de 26 muestras provenientes de dos grupos (Figura 19A). El primero integrado por participantes voluntarios no donadores de sangre con antecedente de punción al triatomino y/o haberla visto dentro de su domicilio (85%). El segundo grupo conformado por ex donadores de sangre cuyas pruebas serológicas durante los exámenes de donación de sangre fueron positivas a *T. cruzi* (15%). Cabe mencionar que todos los participantes fueron residentes en el Estado de Morelos. De estos el 66% fueron hombres y el 44% fueron mujeres (Figura 19B). La edad promedio de la población fue de 28 años en un rango desde los 7 hasta los 72 años (Figura 19C).

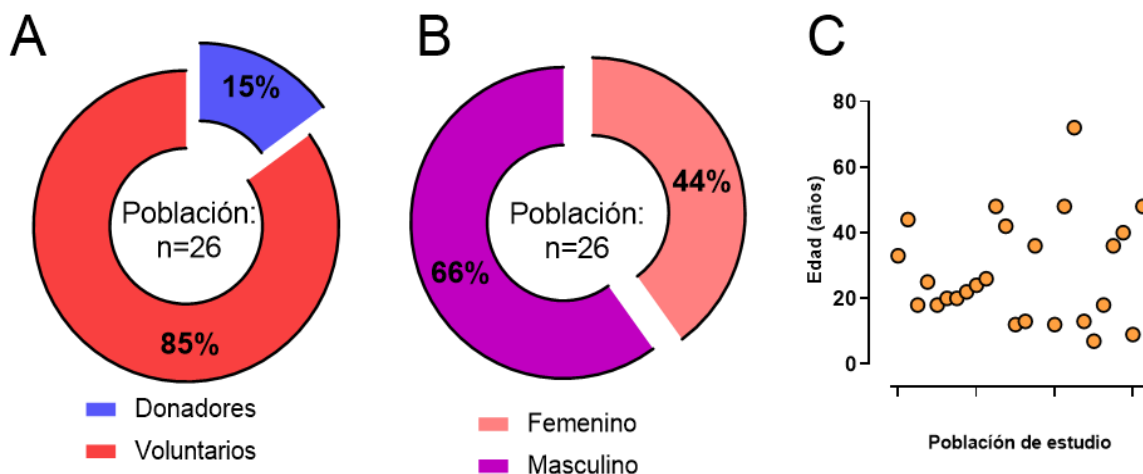


Figura 19. Características de la población estudiada. En A se muestra el tipo de voluntarios que participaron. En B el porcentaje de hombres y mujeres, y en C la distribución de edad de la población estudiada.

En primer lugar, se realizó el análisis serológico de las muestras a través de las pruebas de hemaglutinación indirecta y ELISA. Cabe mencionar que de las 26 muestras solo 23 muestras fueron analizadas por serología (89%) y 3 no fueron analizadas (11%, Figura 20A). De las muestras analizadas el 92% fueron no reactivas a ambas pruebas serológicas, el 4% dieron positivas en ambas pruebas y el 4% obtuvo un resultado indeterminado, es decir en una prueba dieron positivo y en otro negativo (Figura 20B).

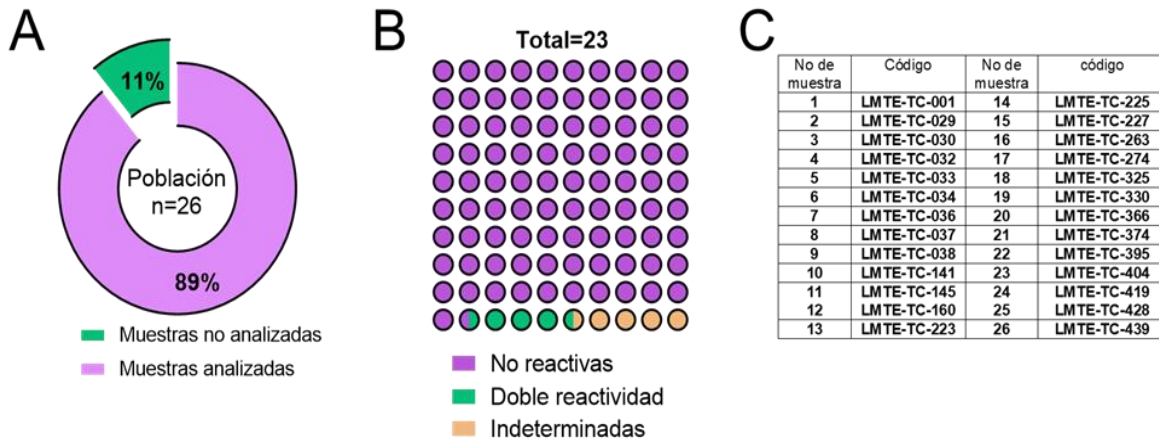


Figura 20. Resultados del análisis serológico utilizando las pruebas de HAI y ELISA. En el panel A se muestra el porcentaje de muestras analizadas. En el B se muestra el resultado de cada muestra en el análisis serológico. En C el código de cada muestra analizada.

Posteriormente para confirmar la infección con *T. cruzi* se realizaron dos pruebas de PCR la PCR TcS35/36 y la PCR dúplex TcTr. De las 26 muestras analizadas que se enviaron a secuenciar, se obtuvieron resultados de 24 muestras que representan el 92%, a las cuales se les realizó el análisis filogenético. Con base en los criterios de inclusión cabe destacar que todas las muestras analizadas dieron resultados positivos en ambas pruebas lo que indican la presencia de la infección por *T. cruzi* y la ausencia de *T. rangeli*. Asimismo, se realizó la prueba de PCR DTU con la finalidad de determinar el DTU y seleccionar aquellas con linaje I. En la tabla 6 se muestra un resumen de los resultados encontrados en las distintas de pruebas de PCR.

Tabla 6. Resultados de las pruebas de PCR realizadas para confirmar la infección por *T. cruzi* y su linaje.

No de muestra	Código	Tipo de PCR			Linaje
		TcS35/36	Dúplex TcTr	DTU	
1	LMTE-TC-001	Positivo	Positivo	Positivo	I
2	LMTE-TC-029	Positivo	Positivo	Positivo	I
3	LMTE-TC-030	Positivo	Positivo	Positivo	I
4	LMTE-TC-032	Positivo	Positivo	Positivo	I
5	LMTE-TC-033	Positivo	Positivo	Positivo	I
6	LMTE-TC-034	Positivo	Positivo	Positivo	I
7	LMTE-TC-036	Positivo	Positivo	Positivo	I
8	LMTE-TC-037	Positivo	Positivo	Positivo	I
9	LMTE-TC-038	Positivo	Positivo	Positivo	I
10	LMTE-TC-141	Positivo	Positivo	Positivo	I
11	LMTE-TC-145	Positivo	Positivo	Positivo	I
12	LMTE-TC-160	Positivo	Positivo	Positivo	I
13	LMTE-TC-223	Positivo	Positivo	Positivo	I
14	LMTE-TC-225	Positivo	Positivo	Positivo	I
15	LMTE-TC-227	Positivo	Positivo	Positivo	I
16	LMTE-TC-263	Positivo	Positivo	Positivo	I
17	LMTE-TC-274	Positivo	Positivo	Positivo	I
18	LMTE-TC-325	Positivo	Positivo	Positivo	I
19	LMTE-TC-330	Positivo	Positivo	Positivo	I
20	LMTE-TC-366	Positivo	Positivo	Positivo	I
21	LMTE-TC-374	Positivo	Positivo	Positivo	I
22	LMTE-TC-395	Positivo	Positivo	Positivo	I
23	LMTE-TC-404	Positivo	Positivo	Positivo	I
24	LMTE-TC-419	Positivo	Positivo	Positivo	I
25	LMTE-TC-428	Positivo	Positivo	Positivo	I
26	LMTE-TC-439	Positivo	Positivo	Positivo	I

Además de lo anterior, se determinó el ciclo de transmisión al que pertenecen y se encontró que 9 pertenecen al ciclo doméstico y cuatro al ciclo peridoméstico. Sin embargo, cabe destacar que en 13 participantes no se pudo determinar dicho ciclo debido a limitaciones en los expedientes clínicos (Figura 21).

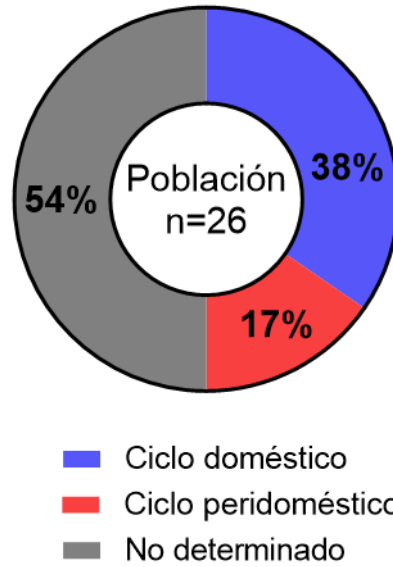


Figura 21. Ciclo de transmisión al que pertenecen las muestras estudiadas.

9.2 Secuenciación de productos de PCR

Una vez seleccionadas las muestras se realizó la purificación del producto de PCR DTU. Cabe mencionar que solo se obtuvo secuencia de 24 de las muestras. En la figura 22 se muestra un esquema del gen y la región espacial de la secuenciación.


```

1 ATGACGTACG AGGGAGCCAT CGGCATCGAT CTCGGCACAA CTTACTCGTG CGTTGGTGT
61 TGGCAGAACG AGCGCGTGGA GATCATTGCG AACGATCAGG GCAGCCGCAC AACGCCGTCG
121 TACGTGGCGT TCACCGACAC GGAGCGTCTG ATCGGTGATG CCGCGAAGAA CCAGGTTGCG
181 ATGAACCCGA CGAACACCGT CTTTCGACGCG AAGCGCCTCA TTGGGCGGAA GTTCAGCGAC
241 CCCGTTGTGC AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCCTTCAAGG TCATCACGAA GGGCGACGAC
301 AAGCCGGTGA TCCAGGTGCA GTTCCGCGGC GAGACAAAGA CGTTCAACCC GGAGGAGGTG
361 AGCTCGATGG TGCTGTCAAA GATGAAGGAG ATTGCGGAGT CGTACCTGGG CAAGCAGGTG
421 AAGAAGGCCG TGGTGA CTGT GCCC GCGTAC TTCAACGACT CCCAGCGGCA GGCAGCAAG
481 GATGCCGGCA CGATCGCGGG GATGGAGGTG CTGCGCATCA TCAATGAGCC GACAGCTGCC
541 GCCATTGCGT ATGGCCTGGA CAAAGTGGAG GACGGCAAGG AGCGCAATGT GCTCATCTTT
601 GACCTTGGCG GCGGCACGTT TGATGTCACG CTGCTGACGA TCGACGGTGG CATCTTTGAG
661 GTGAAGGCGA CGAACGGCGA CACGCACCTG GCGGCGGAGG ACTTTGACAA CCGCCTCGTG
721 TCGCACTCA CGGACGAGTT CAAGCGCAAG AACAAAGGGCA AGGACCTGAC GACAAGCCAG
781 CGCGCCCTCC GCCCCTCCG CACCGCCTG GAGCGCGCCA AGCGCACGCT GTCGTCCGCG
841 GCACAGGCGA CGATTGAGAT CGACGCGTGC TTCGACAACG TGGACTTCCA GGCAACCTC
901 ACTCGCGCCC GCTTCGAGGA GCTCTGCGGC GACCTCTTCC GAGGGACGCT GCAGCCGTTG
961 GAGCGTGTGC TCCAGGACGC CAAGATGGAC AAGCGTGCCG TGCACGACGT GGTGCTCGTC
1021 GGCGGCTCCA CCCGCATTCC AAAGGTGATG CAGCTGGTGT CGGACTTTTT CGGTGGCAAG
1081 GAACTGAACA AGAGCATCAA CCCTGATGAG GCTGTGGCGT ACGGTGCCGC CGTGCAGGCC
1141 TTCATCCTGA CGGGCGGCAA GAGCAAGCAG ACGGAGGGCC TGCTGCTGCT CGACGTGACC
1201 CCGCTGACGC TTGGCATCGA GACGGCGGGT GGCGTCATGA CGTCGCTGAT CAAGCGCAAC
1261 ACGACGATTC CGACCAAGAA AGGACTGCTTCTCGACGTACGCG3' GACAA CCAGCCGGGC
1321 GTGCACATCC AGGTCTTTGA GGGAGAGCGT GCGATGACGA AGGACTGCCA CCTGCTCGGC
1381 ACATTCGACC TGTCCGGCAT CCCGCCGGCG CCGCGCGGTG TGCCCCAGAT TGAGGTGACC
1441 TTTGACCTCG ACGCCAACGG CATCCTGAAC GTGTCCGCGG AGGAGAAGGG CACCGGTAAG
1501 CGCAACCAGA TTGTCATCAC GAACGACAAG GGCCGCCTGA GCAAGGCGGA CATTGAGCGC
1561 ATGGTGTCCG AGGCTGCCAA GTACGAGGCG CAGGACAAGG AACAGCGCGA GCGCATTGAC
1621 GCAAAGAACG GTCTTGAGAA CTACGCATTT TCGATGAAGA ACACCGTAAA CGAGCCGAAC
1681 GTCGCTGGCA AGATTGAGGA GGCCGACAAG AACACGATTA CGAGTGCCGT GGAGGAGGCG
1741 CTGCAATGGC TGAACAACAA CCAGGAGGCC AGCAAGGAGG AGTACGAGCA CCGCCAGAAG
1801 GAGTGGAGA ACCTGTGCAC GCCCATCATG ACGAAGATGT ACCAGGGCAT GGGCGCGGGC
1861 GGCGGTATGC CTGGCGGTAT GCCTGGCGGT ATGCCCGGCG GTATGCCTGG CGGTATGCCT
1921 GGCGGTATGC CCGGCGGTAT GCCTGGCGGT ATGCCTGGTG GAATGCCCGG GGGCATGCCT
1981 GGCGGCGCGA ACCCGTCTGTC TTCGTCAGGA CCGAAGGTGG AGGAAGTTGA CTGA

```

Figura 22. Gen parcial XM 812645.1 *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener *hsp70* ARNm. En verde la región de reconocimiento de los primer *hsp70* DTU-F 5'GCCAGATCTTCTCGACGTACGCG3' y *hsp70* DTU-R 5'GGAGAACCTGTGCACGCCATC3', en amarillo sitio de corte de la enzima HaeIII GG^CC. En rojo la región secuenciada de los aislados de ex donadores de sangre y participantes del estado de Morelos.

9.3 Alineamiento

Posteriormente se realizó el alineamiento del fragmento de 500 pb de las muestras así como de las secuencias control. El análisis del alineamiento de las secuencias de las muestras analizadas del gen *hsp70* de *T. cruzi* mostró que no existen cambios en la secuencia de nucleótidos. Este resultado indica que no existe variabilidad a lo largo de las 500 pb del fragmento secuenciado en todas las muestras analizadas de los pacientes (C, cuadro rojo) con

respecto a las muestras que se tomaron como referencia del GenBank (B, cuadros verdes). Solo es posible ver los cambios en las cepas que se utilizaron como grupo externo (A, cuadro amarillo) y en algunas cepas de referencia (Figura 23). Por lo que se puede decir que la secuencia de pb del fragmento analizado de las cepas mexicanas muestra un 100% de identidad entre ellas.

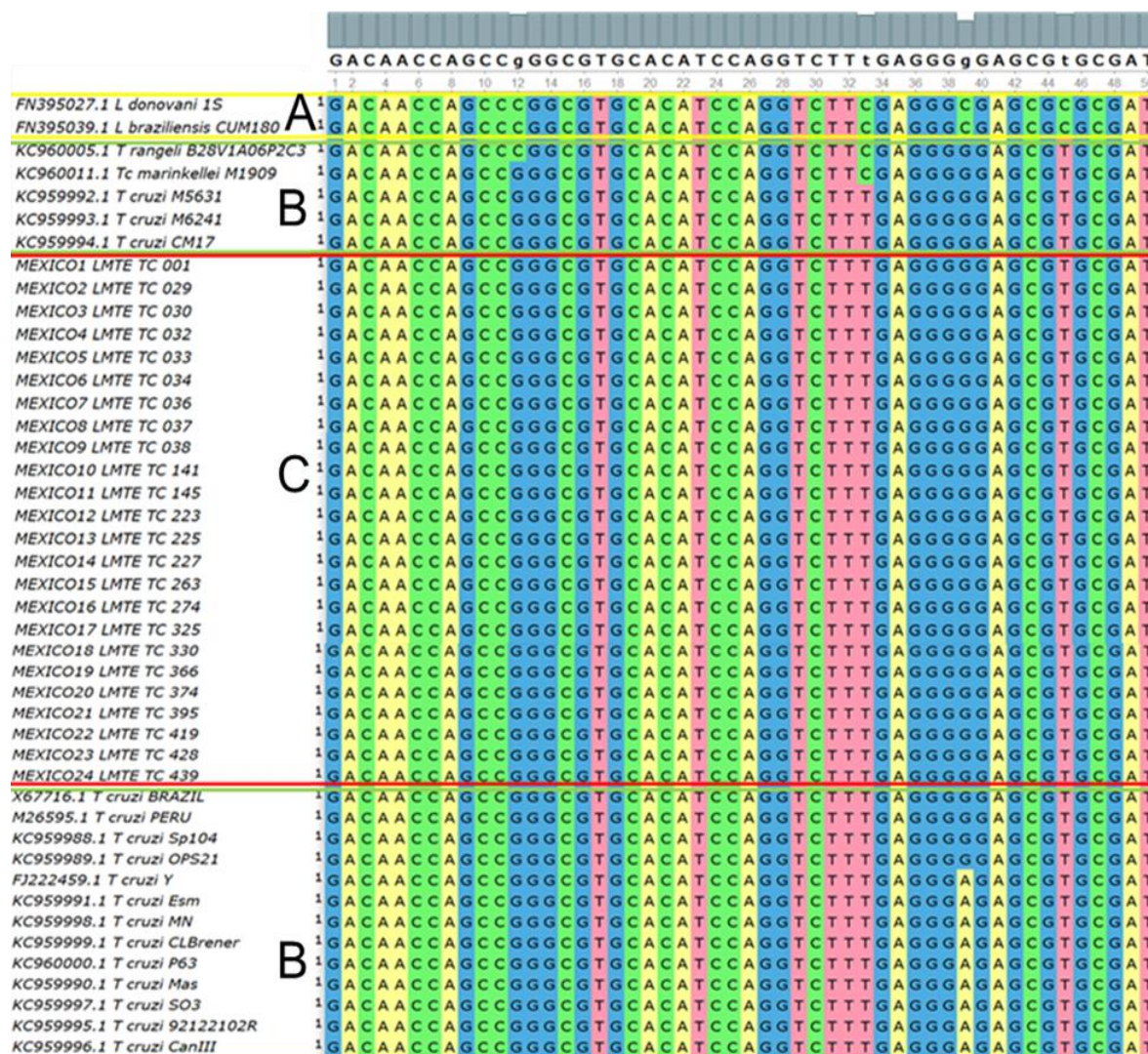


Figura 23. Alineación de las secuencias del gen *hsp70*. Secuenciado a partir de muestras de residentes del estado de Morelos con infección confirmada de *T. cruzi*. Con un promedio de 50 nt. En A se muestra la alineación de las secuencias de las cepas utilizadas como grupo externo. En C se observa las secuencias de las muestras de los residentes de Morelos. Notar que no se observan diferencias en la alineación en ninguna de las muestras analizadas, con respecto a las cepas de referencia tomadas del GenBank (B).

9.4 Análisis filogenético

Posteriormente, se construyeron los árboles filogenéticos a partir del alineamiento múltiple de las 24 secuencias de los aislados mexicanos (en rojo), 18 cepas de referencia del GenBank (recuadro verde) y 2 cepas que se usaron como grupo externo (recuadro amarillo). El árbol consenso obtenido por Máxima Verosimilitud (Figura 24) no muestra una resolución entre las cepas analizadas. Es decir, se observan politomías entre algunos grupos como en el caso de las cepas mexicanas. Dentro de los clados más conservados encontramos el de las cepas conformadas por M5631, CM17 y M6241 identificados con un linaje o DTU III y un valor de 89% de Bootstrap, seguido por el grupo de MN y S03 identificados con DTU V o linaje 7, y el tercer clado conservado es el compuesto por Tc_92122102R y CanIII con registro de DTU IV, con valores de Bootstrap > 80%. Fuera de estos grupos las demás cepas necesitan mayor resolución.

En el análisis de Inferencia Bayesiana (Figura 25), se puede observar que la politomía entre las cepas mexicanas se pierde. Sin embargo, las distancias entre las ramas no tiene valores significativos para establecer relaciones entre ciclos de transmisión, así mismo mantiene una distancia cercana con la cepa de Brasil, la cual no tiene registro de DTU por lo que resulta curioso que se mantenga esa relación, cuando se esperaría que se mantuvieran mas cercanos con la cepas SP104 y OPS21 identificadas con DTU I. Los clados conservados en el primer árbol se siguen manteniendo, así como los valores de probabilidad, a excepción del clado conformado por MN y S03 identificados con DTU V que se integra con las DTU VI.

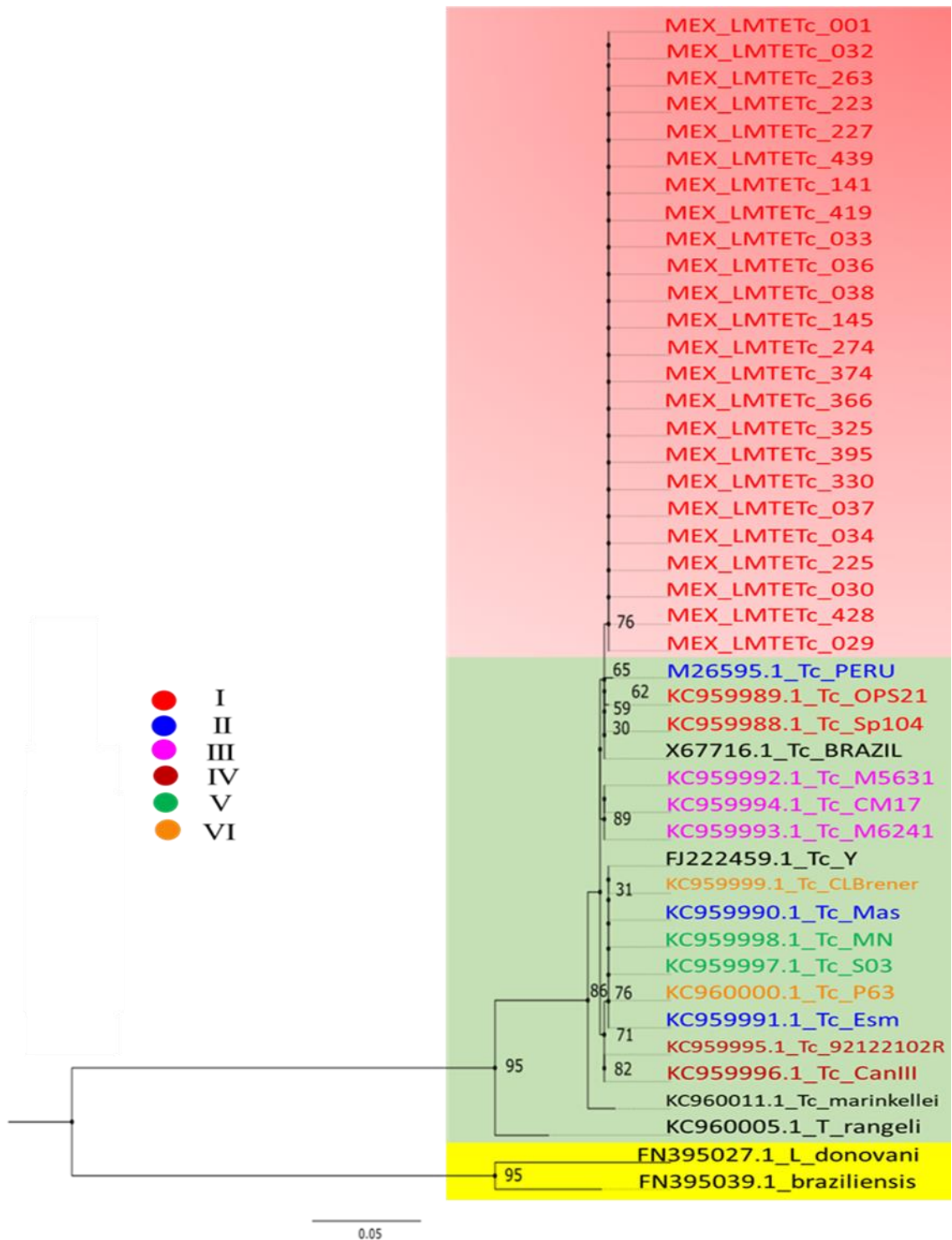


Figura 24. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud de residentes de Morelos. Con infección confirmada de *T. cruzi*. En rojo se encuentran las muestras de los residentes de Morelos con DTU I. En color azul las cepas con DTU II (MAS, Esm y Perú). En rosa las cepas con DTU III (M5631, M6241, CM17). En color vino las cepas DTU IV (92122102R, CanIII). En color verde las cepas DTU V (S03, MN). en color naranja las cepas DTU VI (CL Brener, P63). Valores de Bootstrap. El modelo evolutivo: F81+I.

- I
- II
- III
- IV
- V
- VI

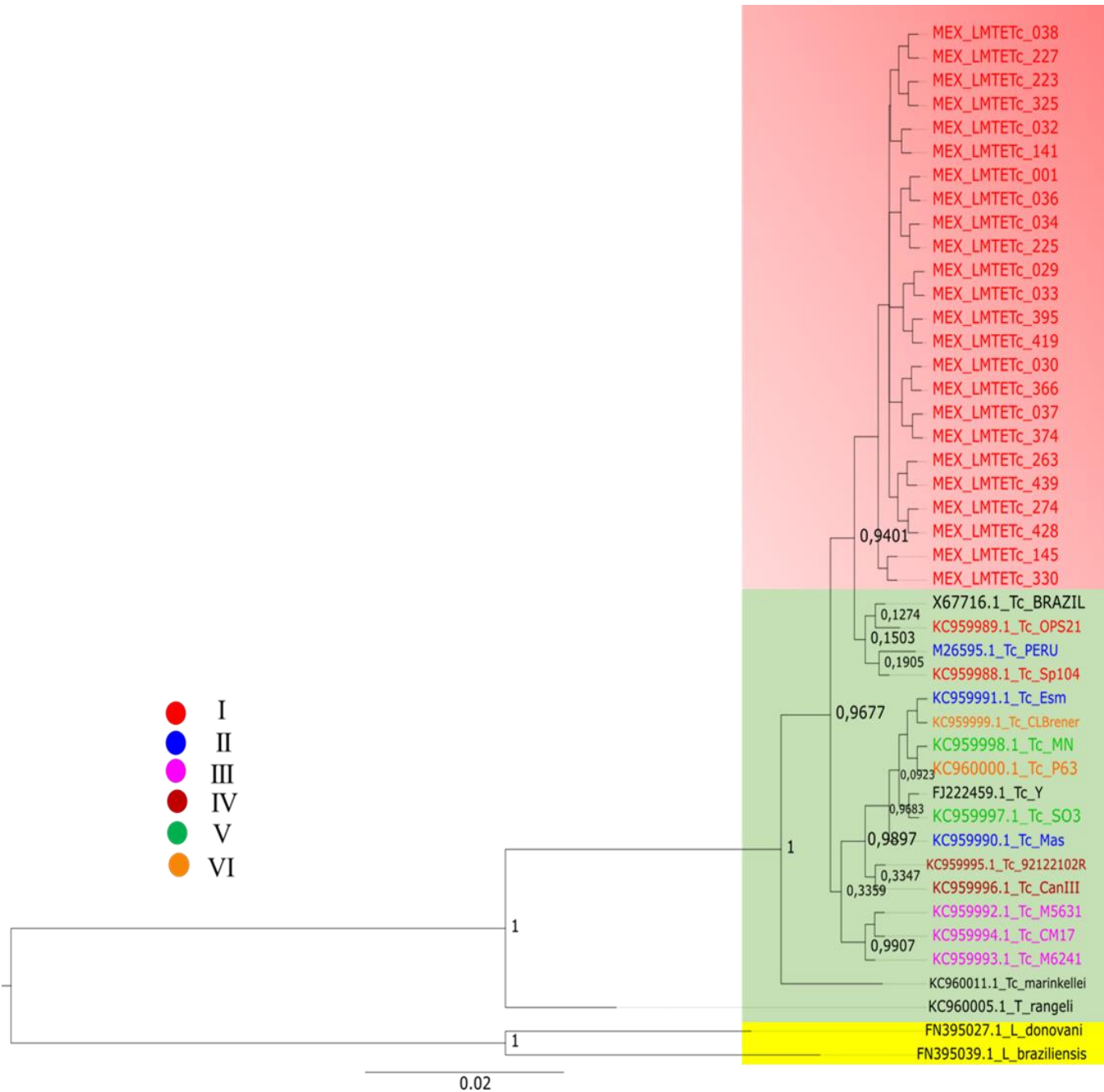


Figura 25. Árbol consenso de Inferencia Bayesiana de residentes de Morelos. Con infección confirmada de *T. cruzi*. En rojo las muestras de participantes de origen mexicano con DTU I, en color azul (MAS, Esm y Perú) cepas con DTU II, en rosa las cepas con DTU III (M5631, M6241, CM17), las cepas DTU IV en color vino (92122102R, CanIII), en color verde las cepas DTU V (S03, MN), las cepas DTU VI en color naranja (CL Brener, P63).

10. DISCUSIÓN

Nuestros resultados del análisis serológico con las pruebas HIA y ELISA mostraron solo el 4% de reactividad, en contraste con las pruebas de PCR que mostraron un 100% de positividad. Estos resultados en conjunto muestran que el sistema serológico tiene baja sensibilidad, razón por la cual no se deberían utilizar como prueba única para realizar el diagnóstico. La baja sensibilidad de estas pruebas en muestras de pacientes mexicanos se ha observado previamente (55). Esta baja sensibilidad se pudiera deber a las discrepancias observadas cuando se hace la comparativa entre diferentes poblaciones. En el caso particular de México generalmente, se ha reportado que existe baja sensibilidad en la detección de los niveles de anticuerpos contra los antígenos de los kits de ELISA en comparación con Argentina y Honduras. Esto se debe en parte a que estos kits utilizan como base cepas de diferentes regiones geográficas y por ello no son tan eficientes para la población mexicana (59). Esta observación es alarmante porque estos estudios se realizaron en la transmisión congénita (23). Aunque el objetivo del presente estudio no es realizar una comparativa entre las pruebas utilizadas para el diagnóstico, resultados previos de nuestro grupo de investigación (54,55), sugieren que es importante valorar la implementación de las pruebas de PCR en aquellos pacientes que presentan resultados discrepantes en las pruebas serológicas, y de esta forma se podría evitar demoras en el proceso de diagnóstico. Si solo se siguen los algoritmos serológicos que se usan actualmente como prueba principal para el diagnóstico surgen la siguiente pregunta. ¿Cuál es el tiempo que tiene que esperar el paciente para un diagnóstico certero? Esta situación es aún más problemática para el paciente ya que para cuando haya sido diagnosticado no se tendrá disponibilidad del tratamiento.

El análisis de diagnóstico implementando el sistema PCR TcS35/36 y la confirmación de la infección con el sistema PCR dúplex TcTr, así como el proceso de genotipificación por PCR-RFLPS DTU *hsp70Tc* son métodos confiables para el diagnóstico de la EC (34,56). Esto lo corroboramos en el presente trabajo al analizar las secuencias y confirmar que el fragmento amplificado en las pruebas de PCRs pertenece al *T. cruzi*. Además, se encontró que, de acuerdo a lo reportado, la DTU I es el que predomina sobre otros linajes (57). Por su parte el análisis filogenético confirmó el clado DTU I en todas nuestras muestras, los valores de soporte nos indican que entre cada una de ellas no existe gran diferencia genética.

Una gran variedad de estudios confirma que *T. cruzi* muestra gran variabilidad genética y una complejidad en la transmisión de la Enfermedad de Chagas que pudiera variar en cada país de América Latina (16,17). Debido a esta variabilidad ha surgido la necesidad de saber si existe una relación entre los diferentes genotipos de *T. cruzi* con las manifestaciones clínicas, el estado de gravedad, y cuál sería el plan de diagnóstico más efectivo, así como en qué momento es oportuno la implementación del tratamiento. Todo lo anterior con la finalidad de favorecer el desarrollo de nuevos fármacos o alternativas en el tratamiento de la enfermedad. Diferentes publicaciones también han mostrado que existe variación intra DTU I (47,49,60). Sin embargo, como lo menciona Ramírez (50) la mayoría de estos estudios se hicieron utilizando una región no codificante como la región intergénica del miniexón y utilizando un número reducido de aislados, lo que en su perspectiva pudiera interferir en el panorama completo al momento de interpretar los resultados. Lo anterior debido a que se pudieran estar observando mutaciones neutras en *T. cruzi*. Por ello, plantea una estrategia metodológica de PCR-RFLP multilocus donde se incluyan regiones codificantes al mismo tiempo que aumenta el número de aislados para ver si los resultados se replican o se pudiera obtener mayor información sobre la relación entre ciclo de transmisión-haplotipo.

En este trabajo se analizó esta variación intra DTU I utilizando el gen de la proteína *hsp70* de *T. cruzi*, aislado de ex donadores de sangre y participantes voluntarios con sospecha de picadura residentes del estado de Morelos, siguiendo la idea de Ramírez sobre este gen. Este estudio utilizó un abordaje metodológico similar hasta el proceso de determinación de linaje, a través de PCR-RFLP, y se agregó el proceso de secuenciación para las muestras de interés.

Durante el alineamiento de las secuencias fue posible observar que las muestras de residentes de Morelos con infección confirmada de *T. cruzi* se situaron en la parte central de la matriz de datos, sin presentar algún tipo de variación en la secuencia del fragmento de 500 pb secuenciado, en comparación con las secuencias que se utilizaron como referencia y grupo externo.

La explicación de estos resultados tiene varias hipótesis. Una puede ser la naturaleza del gen *hsp70*, debido a que la región del fragmento que se analizó se trata de una zona realmente conservada (33) y por ello encontrar posibles “cambios” resulta complejo.

Dado que existen reportes que muestran que existe variación de la DTUI (50) y de que al momento de hacer la determinación no se conocía que DTUs presentaban ni la secuencia de cada una de ellas en las muestras aisladas de nuestros participantes, por lo que fue necesario hacer este análisis, para determinar si existe variación en los aislados de Morelos como en lo ya reportado.

El análisis filogenético realizado a través de la prueba de Máxima Verosimilitud, mostró el mejor modelo evolutivo para la matriz de datos que se formó después del alineamiento de las secuencias, indicando que fue Felsenstein 1981 (F81), así como proporción de sitios invariantes, y K3Pu son los modelos que mejor se ajusta a nuestros datos. El árbol consenso resultante muestra una politomía en las muestras de México. Por su parte en la prueba de inferencia Bayesiana, el árbol consenso rompe con la politomía sobre las muestras de aislados mexicanos, y mantiene una relación cercana con el aislamiento de Brasil, la cual no tiene registro de DTU, por lo que al estar situadas en esa posición pudiéramos considerar que se trata de una cepa DTU I. Así también el clado próximo no cumple con una resolución al 100% y esto pudiera deberse al origen de hibridación que existe entre estos genotipos y desde luego debemos considerar como limitante el solo analizar las 500 pb que nos indica como zona conservada. Por otro lado, lamentablemente, aunque no se cuenta con todos los datos de los ciclos de transmisión en los participantes, sabemos que en el muestreo hay dos ciclos importantes como lo es el ciclo doméstico y peridoméstico, que coincide de acuerdo a las características propias de las zonas geográficas de donde se tomaron los aislados, sin embargo, no se puede concluir la relación de los ciclos debido a la escasa información respecto a los valores de las longitudes de las ramas en todas las muestras de Morelos. A este punto se debe agregar considerar que, aunque se haga el reporte de un vector específico en cierto Estado de la república, este no tendrá el mismo comportamiento (12). Ejemplo de ello, es lo que Monteón (52), describe en la península de Yucatán en *T. dimidiata*, donde identifico el haplotipo Tc Ia, y es que este vector participa en el ciclo peridoméstico y selvático, en Morelos no se tiene registro de *T. dimidiata*, sino más bien de *T. barberi* como domiciliado y *M. pallidipennis* como peridoméstico (6).

Respecto a la posible variabilidad dentro de la DTU I, no se encontró ninguna variación en ninguna de las muestras analizadas. En contraste con lo ya reportado por (50) quienes

encontraron las variaciones o cambios en el gen *hsp70*. Los resultados de estas discrepancias quizá se deban a que el fragmento de 500 pb analizado es altamente conservado. Tenemos la hipótesis de que haciendo la amplificación del genoma completo del gen *hsp70* y revisando las secuencias tendríamos más oportunidad de identificar los sitios de variabilidad. Sin embargo, es poco probable poder hacer esto debido a que nuestro estudio se realizó en muestras clínicas a diferencia de la mayoría de los reportes previos en donde el análisis de la variabilidad genética se realizó a partir de ADN de parásitos mantenidos en cultivo (48,49). A pesar de que no encontramos variabilidad genética en la DTU I, es importante destacar que nuestro proceso de selección de muestras es específico y útil para detectar a *T. cruzi*, lo cual podría representar una ventaja al momento de realizar el diagnóstico, y para estudios de investigación futuros.

11. CONCLUSIONES

- Es posible obtener material genético de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre humanas en las cantidades suficientes para hacer pruebas de pureza e integridad y su posterior amplificación por PCR para la confirmación de la infección, así como para la secuenciación automática por el método de Sanger.
- En conjunto, las pruebas PCR TcS35/36, PCR dúplex TcTr y PCR DTU *hsp70Tc* permiten confirmar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* así como la determinación de las diferentes DTU de la Enfermedad de Chagas, incluso en pacientes que no muestran reactividad serológica.
- El análisis bioinformático de 24 muestras obtenidas de aislados de ex donadores de sangre y participantes voluntarios del Estado de Morelos con registro de DTU I no mostro variabilidad genética intra-clado. Esto muestra que el fragmento de 500 pb de la proteína *hsp70* ubicado entre las bases 1305 y 1805 no es idóneo para este tipo de estudios. Sin embargo, resulta útil para la detección específica de *T. cruzi* a partir de aislados clínicos.

12. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

A la comunidad científica

- Realizar la secuenciación de todo el gen de la proteína *hsp70* de *T. cruzi* para identificar la variabilidad genética de DTU I en residentes de Morelos.
- Confirmar los resultados de variabilidad genética de DTU I, obtenidos por secuenciación y análisis bioinformático, con la técnica de distancias genéticas.
- Realizar el estudio con un mayor número de muestras DTU I confirmadas.
- Refinar la metodología para la obtención de material genético de *T. cruzi* a partir de muestras sanguíneas humanas con el fin de desarrollar un método diagnóstico más eficiente.
- Realizar el análisis de variabilidad genética de las DTU II-VI en residentes del estado de Morelos.
- Realizar el análisis de correlación entre los ciclos de transmisión y la variabilidad genética de DTU I.
- Determinar la presencia de variabilidad genética en los vectores reportados en el estado de Morelos con el objetivo de correlacionar estos datos con los obtenidos a partir de las muestras clínicas de humanos.

A la secretaría de salud

- Brindar capacitación integral sobre la EC al personal del primer nivel de atención (centros de salud, consultorios médicos y unidades de medicina familiar) y sobre el enlace de los pacientes a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP).
- Jurisdicción sanitaria: reducir demoras en el proceso de diagnóstico, para poder entrar al proceso en la RNLSP.
- Actualizar los métodos de diagnóstico de la EC, la evidencia indica deficiencias en el tamizaje de los centros de transfusión sanguínea. Modificar la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, integrando los métodos de PCR.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OPS. Enfermedad de Chagas [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. [cited 2023 Jan 10]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
2. OMS. Chagas-Disease-(American-Trypanosomiasis) [Internet]. 2021. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
3. Rojo-Medina J, Ruiz-Matus C, Salazar-Schettino PM, González-Roldán JF. Enfermedad de Chagas en México. *Gac Med Mex*. 2018;154(5):605–12.
4. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. Vol. 49, *Journal of Physical Oceanography*. American Meteorological Society; 2019.
5. Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, et al. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int* [Internet]. 2017;66(2):83–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>
6. Secretaría de Salud. Manual De Procedimientos Para La Enfermedad De Chagas En México. Secretaría De Salud [Internet]. 2019;1–109. Available from: www.gob.mx/salud/%0Ahttps://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
7. Sánchez-González G, Figueroa-Lara A, Elizondo-Cano M, Wilson L, Novelo-Garza B, Valiente-Banuet L, et al. Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):1–14.
8. López-Monteon A, Montero H, González-Constantino RS, Limón-Flores AY, Varela-Cardoso M, Luna-Hernández G, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women Suggests a High Risk for Congenital Transmission in Central Veracruz, Mexico. *Acta Parasitol*. 2020 Sep 1;65(3):661–8.
9. Sury LCA, Fernando Méndez-Galván J, Soria-Guerrero M, Meneses-Mayo M, Islas-Andrade SA, Jiménez-Cardoso E. Aleatory *Trypanosoma cruzi* Vertical Transmission in Chiapas, Mexico: A Case Report [Internet]. Vol. 16. 2021. Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
10. Chakravarti I, Miranda-Schaeubinger M, Ruiz-Remigio A, Briones-Garduño C, Fernández-Figueroa EA, Villanueva-Cabello CC, et al. Chagas Disease in Pregnant Women from Endemic Regions Attending the Hospital General de Mexico, Mexico City. *Trop Med Infect Dis*. 2022 Jan 1;7(1).

11. Ramsey JM, Townsend Peterson A, Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Nakazawa Y, Butrick M, et al. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):339–52.
12. Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, et al. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 2010;1(1):57–80.
13. Herrera L. *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: Boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. *Front Public Health*. 2014;2(NOV):1–4.
14. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 2004;51(4):205–19.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Ciclo de vida *T. cruzi* [Internet]. [cited 2023 May 13]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
16. Zingales B, M. Michael, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
17. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
18. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009;136(6):641–55.
19. Pino-Marín A, José Medina-Rincón G, Gallo-Bernal S, Duran-Crane A, Duque ÁIA, Rodríguez MJ, et al. Chagas cardiomyopathy: From romaña sign to heart failure and sudden cardiac death. Vol. 10, *Pathogens*. MDPI AG; 2021.
20. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *The Lancet*. 2018;391(10115):82–94.
21. Sanchez-Lermen R de LP, Dick E, Salas JAP, Fontes CJF. Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica\rUpper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas' disease patients. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2007;40(2):197–203. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000200010&lang=pt

22. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2017;184(August):38–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
23. Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Bustamante N, et al. Congenital transmission of *trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An observational prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018;98(2):478–85.
24. Balouz V, Bracco L, Ricci AD, Romer G, Agüero F, Buscaglia CA. Serological Approaches for *Trypanosoma cruzi* Strain Typing. *Trends Parasitol*. 2021;37(3):214–25.
25. Hotez P, Bottazzi ME, Strub-Wourgaft N, Sosa-Estani S, Torrico F, Pajín L, et al. A new patient registry for chagas disease. Vol. 14, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2020. p. 1–6.
26. Martínez I, Noguera B, Martínez-Hernández F, Espinoza B. Microsatellite and Mini-Exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2013;13(3):181–7.
27. Carolina Cura & Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev Esp Salud Publica*. 2013;9–16.
28. Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, López-Monteon A, Dumonteil E. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2012;12(7):1341–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.024>
29. Ibáñez-Cervantes G, Martínez-Ibarra A, Noguera-Torres B, López-Orduña E, Alonso AL, Perea C, et al. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitol Int* [Internet]. 2013;62(1):36–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.003>
30. Jiménez P, Jaimes J, Poveda C, Ramírez JD. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*. 2018;146(3):269–83.
31. Rodrigues MS, Morelli KA, Jansen AM. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):1–18.
32. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The *hsp70* chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(11):665–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>

33. T. Ürményi, R. Silva ER. The Heat Shock Proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem* [Internet]. 2014;74:119–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7305-9>
34. Fraga J, Fernandez-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Tropical Medicine and International Health*. 2014;19(2):195–206.
35. Fraga J, Fernández-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Deborggraeve S, Büscher P, et al. Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;43(May):165–72.
36. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010 Mar;10(2):238–45.
37. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Van der Auwera G, Marín M, et al. Molecular identification of *Leishmania* spp. in clinical isolates from Colombia based on hsp70 gene. *Biomedica*. 2016;36:37–44.
38. Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitol Res*. 2017 Jul 1;116(7):1843–8.
39. Montalvo AM, Fraga J, Goodridge IM, Fidalgo LM, Marin M, Van Der Auwera G, et al. Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using BclI for hsp70 PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 May;104(5):364–7.
40. Lima V, SCdC X, Maldonado I, Roque A, Vicente A, et al. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;9(12):1–16.
41. Tavira O. U. Determinación de linaje en *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos. [Cuernavaca, Morelos]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas; 2014.
42. Garduño-Pineda C. Identificación del linaje de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del Estado de Morelos. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS FACULTAD; 2015.
43. Villanueva-Lizama L, Teh-Poot C, Majeau A, Herrera C, Dumonteil E. Molecular genotyping of *Trypanosoma cruzi* by nextgeneration sequencing of the mini-exon gene reveals infections with multiple parasite discrete typing units in chagasic patients from Yucatan, Mexico. *Journal of Infectious Diseases*. 2019;219(12):1980–8.

44. Garcia MN, Aguilar D, Gorchakov R, Rossmann SN, Montgomery SP, Rivera H, et al. Case report: Evidence of Autochthonous chagas disease in Southeastern Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015;92(2):325–30.
45. Herrera CP, Licon MH, Nation CS, Jameson SB, Wesson DM. Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. *Parasit Vectors*. 2015;8(123):1–9.
46. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*. 1998;14(3):119–24.
47. Herrera C, BARGUES MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2007;7(4):535–9.
48. Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, et al. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res*. 2009;2009:1–9.
49. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop*. 2009;110(1):15–21.
50. Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá ZM, Guhl F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(8):1743–50.
51. Guhl F, Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop* [Internet]. 2011;119(1):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>
52. Monteón V, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo A, Pennington P, Ramos-Ligonio Á, Acosta K, et al. Circulation of Tc Ia discrete type unit *Trypanosoma cruzi* in Yucatan Mexico. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016;40(2):550–4.
53. Ángeles CJ, SOJ, AFJ, RGC, RFH, JPL, ... PCA. Estandarización de un procedimiento por PCR para la detección del *Trypanosoma cruzi* en disponente de sangre humana, serológicamente negativos. Palacio de convenciones. La Habana, Cuba; 2013.
54. Garduño-Pineda C. Empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos clínicamente sanos. [Cuernavaca, Morelos]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas; 2013.
55. Monroy HA. Diagnóstico molecular para la detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre seronegativos del estado de Morelos. [Cuernavaca, Morelos]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas; 2015.

56. Bastidas-Leal. PCR dúplex para la confirmación de la infección por *Trypanosoma cruzi* mediante el gen *hsp70*. [Cuernavaca, Morelos]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas; 2018.
57. Gutiérrez-Reyna. Identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* en la zona centro de México y el estado de Morelos. [Cuernavaca, Morelos]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2021.
58. Sangenito LS, Branquinha MH, Santos ALS. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Trop Med Infect Dis.* 2020;5(2).
59. Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Cafferata ML, Ciganda A, Gibbons L, et al. Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection [Internet]. 2021. Available from: <https://doi.org/10>
60. Cura CI, Mejia-Jaramillo AM, Duffy Tomas, Burgos JM, Rodriguero M V., Kjos S, et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *Bone.* 2009;23(1):1–7.

Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Variabilidad genética de Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico 70 de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos**”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenia Lizeth Bastidas Leal. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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.

Atentamente

M. en C. Verónica Chávez López



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

VERONICA CHAVEZ LOPEZ | Fecha:2023-05-26 14:13:14 | Firmante

IvhnyFv6JWkeejaX54GABZHHGQArpn7nn4hvwDI9HQ3kPBUEAVz8q84I7ff5jzRrX4S3RQ+rFqpbWhIRbylXLdciowuxrX8Pk5rA/rYOYqFMhQLq8HHaZKnb3PPFy9IOZspByMwEDhyu7oYxuW+5cdBcjOaREGS18AfoVtkkMpAyFxe09alwCyouptSmfm49HRH2bYzj24IQogNf/GGNMvsj0O5CfMwgeslCsC3BCtpGX9XmHgy5oOEeSEh9qK+3xSSA2c2NqUVN3R14DIbChGOfQMAfvFLXLXhIpmavxKKDOt17D1mdgoEwx/Lmvc3u/C4hT+2jwu4g9hHohclSuA==

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



[A4nZOdHIR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/drjYCBFYc00SJR18uykPg9w7AG8P7ZuY>



Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Variabilidad genética de Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico 70 de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos**”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenia Lizeth Bastidas Leal. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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.

Atentamente

Dra. Luz María González Robledo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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:2023-05-25 15:13:34 | Firmante

FTFkpFSOL/bByLwodygt2ensTj2dJy+BibxmwH/N4RSWIYP3HdjXD6wVl1NGTpcQrzOtv6CBuUw9z7TLmITcXDo8jMfFg3RwsEUzLqsy+Fy+TUplDaiw92TA2+mRluFTfsluBOZXwl
L0ZY/2RhuHjFO9SXZlrUmPTdmKbpV/GzNqM+jwKGNTWwrrvwUKB9JhYaFj8woklQqRusH07N8nJCADzolzwhqujlpNrQVXLSjb9nLIFVtRO8fmf9lpS3Mn5q3rYPi6/SCLdMsQBqJPc
14N8pCrz05wMgfv36mKsyzNz7heTiaEoSp2NJRgHIVxhLmCtQzLwO1HmcS5ClaP+6Vg==

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



[RFE6tv5AJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dw6rsjZS4NCnOg7tYCywPBIDK3yNyQgu>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Variabilidad genética de Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico 70 de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos**”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenia Lizeth Bastidas Leal. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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.

Atentamente

Dr. Juan José Acevedo Fernández





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-05-25 22:59:08 | Firmante

eL7rQ0djCL7g6FjDpvNW1pD6k4erW9yUvSlgHerpBnV0BRmrERI/Vb23FP5ENornbl8Edm4ChK+6YA40t7qfXJ4K4uBtvjk6YyZLcnm9TOBePKDvqrLIHbjivPbGDWlb5+PfebTgZfV
YbJ3VFku8IhIJWdmzebCTMqendS58vklx+fvrdfyzZIFDKI1WlIfB6VH8euC9k9erBS6AkqdtgckIQYaQakWDQY6lFvt/QnRIKefk1xUTMEayS00uBtsemFai3UkekoO0t0olSNJcEd1jJ
wVZJyslSXYq91qf+omTRxl7inhqYjFWrGkkjVWx75UbWEk9PUxZXk6wvjFyMg==

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



[IdvsOeuTr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HnNVog6YELk2RgOrC2WMhhC9BiVrLRXj>



Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Variabilidad genética de Unidades Discretas de Tipificación I (DTU I) basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico 70 de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos**”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenia Lizeth Bastidas Leal. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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.

Atentamente

Dra. Gabriela Castañeda Corral



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2023-05-25 16:11:40 | Firmante

MoRB/Cu6T2GdYICTETxpilxdbdoYVG7AT/uq5fAsukthWfefz5VMqjKrMQQMBBoNCUuS6Nkbhc93o5NkBXMGvjtCp4mXQVkrEjrmURiDzlgg+esYjki7gVG+itFt4r6JbpWHjRvmbD
FaYLFYwudVjo+yyIRh/L0VfRUOJ+s4wzHAQMuti9FkPdYHCq123VMqFqvMIWLoqmqxQz8kpuENKfHnlqXfAvBsT1n1D2u80Y9has4umRKFey7R3pg6eg8SO1A+Ral8rmkG9zuzs
mNif5M+xs6d9XEbtrQnbTvPKewkG6z/emkpuD5z7ID+1l+XuffB5LAM5YyAzN3wxzyPYDw==

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



[zUeohVmf9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CIP6ZS5Z5pld8CDWQytE933hckYw0Exh>

